

Klinische Forschergruppe Sepsis
Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar
Technische Universität München

Funktionen des Neuropeptids CGRP bei der neuronalen Kontrolle des hämatopoetischen Systems

Marit Daniela Harzenetter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 26.11.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21.01.2004 angenommen.

***Die edle Einfalt in den Werken der Natur
hat nur gar zu oft ihren Grund
in der edlen Kurzsichtigkeit dessen,
der sie beobachtet.***

Georg Christoph Lichtenberg (1742-1799)

A. Einleitung	1
A.1 Calcitonin Gene-Related Peptide.....	1
<i>A.1.1 CGRP wirkt als Neuropeptid.....</i>	<i>1</i>
<i>A.1.2 Struktur und Funktion des CGRP-Rezeptors</i>	<i>2</i>
<i>A.1.3 Die Funktionen von CGRP</i>	<i>4</i>
A.2 Die primäre Abwehr von Mikroorganismen durch das angeborene Immunsystem	6
<i>A.2.1 Dendritische Zellen.....</i>	<i>9</i>
<i>A.2.2 Verbindung zwischen Neuropeptiden und dem angeborenen Immunsystem ...</i>	<i>11</i>
A.3 Ziele dieser Arbeit.....	13
B. Material und Methoden	14
B.1 Material.....	14
<i>B.1.1 Bezugsquellennachweis.....</i>	<i>14</i>
<i>B1.1.1 Chemikalien.....</i>	<i>14</i>
<i>B.1.1.2 Enzyme.....</i>	<i>15</i>
<i>B.1.1.3 Radiochemikalien.....</i>	<i>16</i>
<i>B.1.1.4 Zellkulturmedien</i>	<i>16</i>
<i>B.1.1.5 Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>17</i>
<i>B.1.1.6 Geräte</i>	<i>17</i>
<i>B.1.2 Puffer und Lösungen</i>	<i>18</i>
<i>B.1.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Mausstämme</i>	<i>23</i>
<i>B.1.3.1 Bakterienstämme.....</i>	<i>23</i>
<i>B.1.3.2 Bakterielle Nährmedien</i>	<i>23</i>
<i>B.1.3.3 Zelllinien</i>	<i>24</i>
<i>B.1.3.4 Kulturmedien.....</i>	<i>25</i>
<i>B.1.3.5 Mausstämme.....</i>	<i>25</i>
<i>B.1.4 Vektoren</i>	<i>25</i>
<i>B.1.5 Antikörper</i>	<i>26</i>
<i>B.1.5.1 Erstantikörper und Überstände.....</i>	<i>26</i>
<i>B.1.5.2 Zweitantikörper</i>	<i>28</i>
<i>B.1.5.3 Isotypkontrollen.....</i>	<i>28</i>
B.2 Zellbiologische Methoden	28
<i>B.2.1 Kultivierung von Zelllinien</i>	<i>28</i>
<i>B.2.1.1 Suspensions-Zelllinien</i>	<i>28</i>
<i>B.2.1.2 Adhärent wachsende Zelllinien</i>	<i>28</i>
<i>B.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl.....</i>	<i>28</i>
<i>B.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....</i>	<i>29</i>

<i>B.2.2 Zellbiologische Methoden humaner Primärzellen.....</i>	<i>29</i>
<i>B.2.2.1 Isolierung von Granulozyten und CD34⁺-Zellen.....</i>	<i>29</i>
<i>B.2.2.2 In vitro Granulopoese von CD34⁺-Zellen</i>	<i>29</i>
<i>B.2.2.3 Clonal Colony Assays.....</i>	<i>29</i>
<i>B.2.3 Isolierung muriner Primärzellen</i>	<i>30</i>
<i>B.2.3.1 Präparation von Knochenmarkszellen.....</i>	<i>30</i>
<i>B.2.3.2 Präparation von Milzzellen</i>	<i>30</i>
<i>B.2.3.3 Präparation von Leukozyten.....</i>	<i>31</i>
<i>B.2.3.4 Präparation von Peritonealmakrophagen</i>	<i>31</i>
<i>B.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Scan)</i>	<i>31</i>
<i>B.2.4.1 Oberflächenfärbung</i>	<i>31</i>
<i>B.2.4.2 Intrazelluläre Färbung</i>	<i>31</i>
<i>B.2.5 Zellsortierung im Hochleistungsdurchflusszytometer MoFlo.....</i>	<i>32</i>
<i>B.2.6 Nachweis von cAMP.....</i>	<i>32</i>
<i>B.2.7 Nachweis von Chemokinen und Zytokinen mittels ELISA</i>	<i>32</i>
B.3 Proteinanalytische Methoden	33
<i>B.3.1 Aufbereitung der Proben</i>	<i>33</i>
<i>B.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	<i>33</i>
<i>B.3.3 Westernblot (Immunoblot).....</i>	<i>34</i>
B.4 Molekularbiologische Methoden.....	35
<i>B.4.1 Nachweis spezifischer mRNA in Zellen.....</i>	<i>35</i>
<i>B.4.1.1 Präparation von Gesamt-RNA.....</i>	<i>35</i>
<i>B.4.1.2 Präparation von Gesamt-RNA mit RNeasy Mini (Quiagen)</i>	<i>35</i>
<i>B.4.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration.....</i>	<i>35</i>
<i>B.4.1.4 Agarosegel zur Überprüfung der isolierten RNA auf Degradation</i>	<i>36</i>
<i>B.4.1.5 Nachweis von RNA (Northern Blot).....</i>	<i>36</i>
<i>B.4.1.6 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription).....</i>	<i>37</i>
<i>B.4.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	<i>38</i>
<i>B.4.1.8 Semiquantitative PCR</i>	<i>41</i>
<i>B.4.1.9 Real-Time PCR mittels TaqMan</i>	<i>41</i>
<i>B.4.1.10 Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel.....</i>	<i>42</i>
<i>B.4.2 Nachweis von DNA (Southern Blot).....</i>	<i>43</i>
<i>B.4.3 Radioaktive Markierung von Sonden.....</i>	<i>44</i>
<i>B.4.4 Restriktionsverdau von DNA</i>	<i>44</i>
<i>B.4.5 Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren.....</i>	<i>45</i>
<i>B.4.5.1 Ausschneiden von DNA aus einem Vektor</i>	<i>45</i>
<i>B.4.5.2 DNA-Elution aus einem Agarosegel.....</i>	<i>45</i>
<i>B.4.5.3 Dephosphorylierung eines Vektors.....</i>	<i>45</i>
<i>B.4.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten und Enzymansätzen.....</i>	<i>45</i>

B.4.5.5 DNA-Ligation.....	46
B.4.6 Transformation von Bakterien.....	46
B.4.6.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	46
B.4.6.2 Transformation kompetenter Bakterien.....	47
B.4.7 Präparation von Plasmid-DNA.....	47
B.4.7.1 Minipräparation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke.....	47
B.4.7.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	48
B.4.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	48
B.5 Syngene Transplantation von Knochenmark.....	48
B.5.1 Herstellung des Virusüberstandes	49
B.5.2 Spininfektion des Knochenmarks.....	49
B.5.3 Transfer des infizierten Knochenmarks.....	49
B.6 Statistische Auswertung	50
C. Ergebnisse	51
C.1 Regulation und Funktion des CGRP Rezeptor Komplexes in der humanen Granulopoese	51
C.1.1 Differentielle Expression des CGRP Rezeptor Komplexes	51
C.1.2 Herunterregulierung des CGRP-Rezeptors während der Granulopoese <i>in vitro</i>	54
C.1.3 Der Einfluß von CGRP auf die <i>in vitro</i> Myelopoese	56
C.2 Die Bedeutung der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 in der murinen Hämatopoese	57
C.2.1 Retrovirale Transduktion von mRAMP-1 in NIH 3T3/CRLR Zellen	57
C.2.2 Überexpression von mRAMP-1 in Knochenmarkszellen durch retroviralen Gentransfer.....	58
C.2.3 Hämatopoetische Aktivität von RAMP-1 transduzierten Knochenmarkszellen ...	59
C.2.4 Lokalisation von RAMP-1 transduzierten Knochenmarkszellen in Knochenmark und Milz.....	60
C.3 Die Rolle von RAMP-1 in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark	61
C.3.1 Differentielle Regulation des CGRP-Rezeptors	62
C.3.2 Differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen	63
C.4 Die Bedeutung von CGRP bei der Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen.....	65
C.4.1 Generierung von Dendritischen Zellen	65
C.4.2 Expression des CGRP-Rezeptors	67
C.4.3 Modulation der Zyto- und Chemokinproduktion aktivierter Dendritischer Zellen mit dem Neuropeptid CGRP	68

A: Einleitung

A.1 Calcitonin Gene-Related Peptide

Im Jahre 1983 wurde von Rosenfeld *et al.* das *α -calcitonin gene-related peptide* (α -CGRP) zunächst in Ratten (Rosenfeld *et al.*, 1983), dann auch im Menschen identifiziert (Morris *et al.*, 1984).

Das Peptid ist 37 Aminosäuren lang und wird nach alternativem splicing des primären RNA Transkripts vom Calcitonin/CGRP Gen translatiert (Amara *et al.*, 1982; Rosenfeld *et al.*, 1981). Die Translation von CGRP bzw. Calcitonin erfolgt gewebespezifisch. So wird im zentralen und peripheren Nervensystem vor allem CGRP synthetisiert, in den parafollikulären Zellen der Schilddrüsen Calcitonin (Leff *et al.*, 1987; Van Rossum *et al.*, 1997).

Das α -CGRP Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 p14 qter Region. Ein zweites Gen für CGRP (β -CGRP) liegt ebenfalls auf dem Chromosom 11 (p12 qter p14). Das humane β -CGRP unterscheidet sich in drei Aminosäuren vom homologen α -CGRP (Wimalawansa *et al.*, 1987). Hinsichtlich ihrer Expression oder Funktion sind keine Unterschiede bekannt (Brain *et al.*, 1985).

Zwischen den Spezies sind die Aminosäuresequenzen von CGRP stark konserviert. Zusammen mit Amylin, Calcitonin und Adrenomedullin bildet CGRP eine Peptidfamilie. Sie zeichnet sich durch eine N-terminale Ringstruktur aus 6 bis 7 Aminosäuren, die über eine Disulfidbrücke stabilisiert wird, und einem amidierten C-Terminus aus (Goodman *et al.*, 1986; Muff *et al.*, 1995; Poyner *et al.*, 1992).

A.1.1 CGRP wirkt als Neuropeptid

Phylogenetisch gesehen wurden Neuropeptide bereits sehr früh als Moleküle interzellulärer Kommunikation eingesetzt. Cnidaria, zu denen die *Hydra*, *Scyphozoa* (Quallen) und *Anthozoa* (Korallen) zählen, sind die niedrigste Tiergruppe, die ein Nervensystem ausbilden. Als Transmitter in diesem einfachen Nervensystem dienen ausschließlich Peptide (Shaw *et al.*, 1996).

Das Nervensystem hat sich zu einem hoch komplexen Apparat entwickelt, das in seiner höchstentwickelten Form bei den *Cephalopoda*, *Arthropoda* und *Vertebratae* als zentrales Nervensystem (ZNS) organisiert ist. Acetylcholin und Aminosäurederivate, wie Dopamin, Serotonin und Glutaminsäure sind Neurotransmitter an chemischen Synapsen im zentralen und peripheren Nervensystem stammesgeschichtlich höher entwickelter Tierarten. Dennoch haben auch Neuropeptide nicht an Bedeutung verloren.

Neuropeptide werden analog zu anderen Peptiden oder Peptidhormonen (z.B. ACTH, Tachykinine, Parathyroide Hormone) als inaktive Vorstufe (Precursor) im Zytoplasma synthetisiert und werden dann entlang der Mikrotubuli der Axone zum Nerveterminus transportiert, wobei sie prozessiert werden. Vom inaktiven Precursor wird zunächst die Signalsequenz abgespalten und oft andere Peptidsequenzen, so dass mehrere Neuropeptide entstehen können. Das so entstandene Peptid wird häufig modifiziert, beispielsweise durch Disulfidbindungen (Hoppener *et al.*, 1987; Mains *et al.*, 1990).

A.1.2 Struktur und Funktion des CGRP-Rezeptors

Bereits 1996 wurde von Aiyar *et al.* die cDNA für den *calcitonin receptor-like receptor* (CRLR) kloniert. Die cDNA codiert ein Protein, das 461 Aminosäuren umfasst und das die typischen Charakteristika von G-Protein gekoppelten 7-Helix Rezeptoren zeigt. In HEK293 Zellen, die mit CRLR transfiziert waren, konnte die Bindung von CGRP an CRLR beobachtet und auch eine CGRP-vermittelte Antwort detektiert werden. McLatchie *et al.* (1998) zeigten im Folgenden, dass der funktionelle CGRP Rezeptor aus einem Heterodimer von RAMP-1 (*receptor activity modifying protein-1*) und CRLR besteht.

CRLR und der Calcitonin-Rezeptor weisen eine Aminosäureidentität von 55% auf. Beide gehören der Familie B der Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren an. Ebenfalls zu dieser Familie gehören die Rezeptoren für das Parathormon (PTH), das Parathyroid-related Hormon, für Sekretin, Glukagon, *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) und *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) (Fluhmann *et al.*, 1995; Njuki *et al.*, 1993).

Die zweite Komponente RAMP-1 bildet zusammen mit RAMP-2 und RAMP-3 eine Familie von Proteinen, welche charakteristischerweise aus einer kurzen zytoplasmatischen (10 Aminosäuren), einer transmembranen und einer langen aminoterminalen extrazellulären Domäne (~ 100 Aminosäuren) besteht (Mc Latchie *et al.*, 1998). Das humane RAMP-1-Protein umfasst 148 Aminosäuren. Die RAMP-Proteine weisen untereinander nur geringe Homologie auf.

Das murine RAMP-1 wurde zunächst als CATS-1 (*Cell adhesion regulating protein of tissue stroma-1*) bezeichnet. Das murine und humane RAMP-1 weisen eine Homologie von 71% auf. In weiterführenden Untersuchungen wurden sowohl strukturelle als auch funktionelle Homologien bestätigt (Riedl *et al.*, 2000).

Wird RAMP-1 alleine exprimiert, so liegt es im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat als Homodimer vor. Wird es zusammen mit CRLR exprimiert, so sind beide Rezeptoruntereinheiten als Heterodimer in der Zellmembran lokalisiert (Hilairet *et al.*, 2001).

RAMP-1 agiert dabei als Chaperone, das für den Transport von CRLR an die Zytoplasmamembran benötigt wird und die posttranslationale Modifikation von CRLR reguliert.

Außerdem wird die Rezeptorspezifität von CRLR für CGRP durch RAMP-1 determiniert (McLatchie *et al.*, 1998).

CRLR kann mit RAMP-2 oder RAMP-3 assoziiert sein und stellt dann einen Rezeptor für das Neuropeptid Adrenomedullin dar. Die Rezeptorspezifität wird über direkte Protein-Protein-Interaktionen von CRLR und RAMP erreicht, nicht durch unterschiedliche Glykosilierungen, wie zunächst vermutet wurde (Hilairet *et al.*, 2001; McLatchie *et al.*, 1998).

Bindung von CGRP an seinen Rezeptor führt zur Aktivierung und im Folgenden zur Phosphorylierung von CRLR. Die Phosphorylierung erfolgt über die G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase 6 (GRK6), führt zu einer verminderten Agonisten-Responsivität des Rezeptors und initiiert die Internalisierung des Rezeptorkomplexes über *clathrin-coated pit-mediated endocytosis* (Aiyar *et al.*, 2000; Hilairet *et al.*, 2001).

Stimulation des Rezeptorkomplexes mit CGRP führt, abhängig von $G_{\alpha s}$ -Proteinen über die Adenylatzyklase, intrazellulär zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels (Wimalawansa *et al.*, 1987). Desweiteren kann CGRP abhängig von $G_{\alpha q/11}$ -Proteinen die Phospholipase C aktivieren, in deren Folge es zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels kommt (Drissi *et al.*, 1998). Ein selektiver Antagonist des CGRP Rezeptors ist CGRP₈₋₃₇, dem N-terminal die sieben ringbildenden Aminosäurereste fehlen (Dennis *et al.*, 1991).

Zuletzt wurde eine dritte intrazellulär lokalisierte Rezeptorkomponente identifiziert, das CGRP-receptor component protein (CGRP-RCP) (Evans *et al.*, 2000). Dieses co-immunopräzipitiert mit CRLR und ist ein entscheidender Bestandteil von CGRP- und Adrenomedullin-vermittelter Signaltransduktion (Abbildung 1).

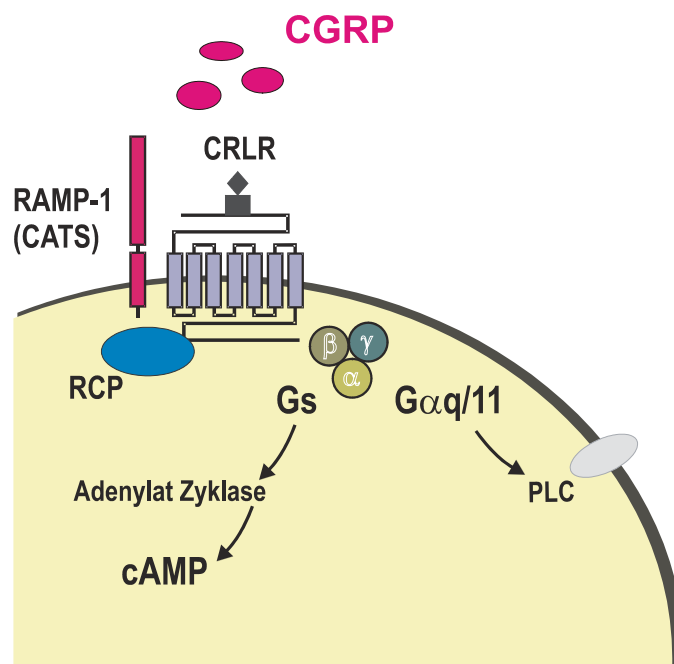


Abbildung 1: Struktur des Rezeptors für das Neuropeptid CGRP

A.1.3 Die Funktionen von CGRP

Das Neuropeptid CGRP weist eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Funktionen auf. Einerseits gilt CGRP als ein sehr potenter Vasodilatator, andererseits ist CGRP in den Verlauf einer Sepsis involviert. Im Knochenmark moduliert CGRP die Hämatopoese und an neuroimmunologischen Schnittstellen vermittelt CGRP immunsuppressive Effekte.

CGRP WIRKT VASOAKTIV

Eine wichtige Funktion von CGRP liegt in der Assoziation von CGRP-enthaltenden Nervenfasern und Blutgefäßen begründet. CGRP wird von afferenten Nervenfasern in den perivaskulären Spalt abgegeben und diffundiert dann ins venöse Blut. CGRP gilt als einer der potentesten Vasodilatoren im Bereich der cerebralen, coronaren und mesenterialen Gefäße (Brain *et al.*, 1985; Mallee *et al.*, 2003; Mulderry *et al.*, 1985). Neuere Studien belegen die zentrale Rolle von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne. Während eines Migräneanfalls sind die CGRP-Levels im Bereich der craniellen Zirkulation erhöht. Behandlung der Patienten mit Sumatriptan resultierte in einer Normalisierung der CGRP-Levels. Da in der Migräne die cerebralen Blutgefäße dilatiert sind und das trigeminovaskuläre System aktiviert ist, könnten diese Beobachtungen auf eine Inhibierung der CGRP-vermittelten Vasodilatation hindeuten und seine therapeutische Bedeutung hervorheben (Edvinsson, 2003; Goadsby *et al.*, 1993; Lassen *et al.*, 2001).

CGRP IST IN DEN VERLAUF DER SEPSIS INVOLVIERT

CGRP ist als vasoaktives und immunmodulatorisches Peptid ein wichtiger Mediator in der Pathogenese der Sepsis.

Die Postoperative Sepsis ist mit einem signifikanten Anstieg der CGRP Serumlevels assoziiert. Systemische CGRP Spiegel waren in Patienten, die die postoperative Sepsis nicht überlebten, signifikant höher als in Patienten, welche die postoperative Sepsis überlebten. Dabei wurden bereits am Tag 1 der Sepsis erhöhte Serumspiegel gemessen, die während des gesamten Sepsisverlaufs erhöht blieben. Das Neuropeptid Substanz P war in septischen Patienten ebenfalls erhöht, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Patienten, die die Sepsis überlebten und denen die verstarben erst in der finalen Phase der Sepsis auftraten (Beer *et al.*, 2002).

Auch im Mausmodell moduliert CGRP die Entzündungsreaktion. Die Sekretion der Chemokine KC und MIP-2 wurden nach muriner Sepsis, die durch Coecum Ligatur und Punktion (CLP) induziert wurde, vermindert (Wang *et al.*, 2002).

CGRP MODULIERT DAS MICROENVIRONMENT IM KNOCHENMARK

CGRP und andere Neuropeptide wurden in Nervenfasern nachgewiesen, die in primären lymphoiden Organen und im Knochenmark terminieren (Hosoi *et al.*, 1993; Weihe *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 1990).

Mechanische Denervierung des Femurs oder die Depletion von Neuropeptiden nach Capsaicinbehandlung führte in Experimentaltieren zu einer Suppression der Hämatopoese. Die Blutzellproduktion und die Anzahl der granulo-monozytären-Vorläuferzellen im Knochenmark waren stark reduziert (Afan *et al.*, 1997; Broome *et al.*, 2000). CGRP zeigte im Gegensatz zu anderen Neuropeptiden einen direkten stimulatorischen Effekt auf myeloide Progenitorzellen des Knochenmarks (Broome *et al.*, 2000). CGRP könnte somit ein wichtiger Mediator der neuronalen Kontrolle der Hämatopoese sein.

Klinische Studien belegen diese am Tiermodell beobachtete neuronale Kontrolle der Hämatopoese. Patienten mit vollständigen Querschnittsverletzungen zeigten im dezentralisierten Knochenmark eine stark verminderte hämatopoetische Aktivität (Iversen *et al.*, 2000).

Myeloische Leukämien gehen auf die maligne Transformation unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen zurück. Die Proliferation und Selbsterneuerung leukämischer Vorläuferzellen ist von exogenen Signalen des Knochenmarksmilieus abhängig. Es sind daher Befunde von Interesse, wonach die Rezeptorkomponenten RAMP-1 und CRLR bei akuter myeloischer bzw. akuter megakaryoblastischer Leukämie auf den Tumorzellen exprimiert waren. Bei chronisch myeloischer Leukämie war jedoch keine der beiden Rezeptorkomponenten ausgeprägt. In verschiedenen T- und B-Lymphom-Zelllinien wurden beide Rezeptoruntereinheiten zwar nachgewiesen, doch war ihre Expression geringer als in lymphatischen Organen (Riedl *et al.*, 2000).

CGRP IST IN NEURO-IMMUNOLOGISCHEN KOMMUNIKATIONEN BETEILIGT

Zwischen dem Nerven- und dem Immunsystem des Körpers besteht eine Interaktion. Immunzellen sind im ganzen Körper einer Vielzahl von Neurotransmittern ausgesetzt, die von lokalen Nervenfasern sezerniert werden. Um die von den Nervenfasern abgegebenen Botenstoffe in intrazelluläre Signale umsetzen zu können, exprimieren Immunzellen Rezeptoren für spezifische Neurotransmitter (Levite *et al.*, 2001).

Das Neuropeptid CGRP vermittelt in neuro-immunologischen Kommunikationen vor allem immunsuppressive Effekte. Werden antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Dendritische Zellen, mit CGRP stimuliert, so werden vermindert Antigene präsentiert. Dabei wurden MHC Klasse II und B7 Proteine herunterreguliert (Carucci *et al.*, 2000). Die Produktion des proinflammatorischen Interleukin- (IL-) 12p40 wurde herunterreguliert und die des antiinflammatorischen IL-10 hochreguliert (Fox *et al.*, 1997). Analog zu diesen *in vitro* Befunden konnte *in*

vivo gezeigt werden, dass CGRP die Interferon (IFN)- γ -Produktion von Milzzellen und Th1-Zellen verminderte (Kawamura *et al.*, 1998). In T-Lymphozyten suppressierte CGRP die IL-2 Produktion sowie die Proliferation (Wang *et al.*, 1992). Desweiteren verhinderte die Administration von CGRP eine *delayed-type* (DTH) und Kontakt Hyper-sensitivitätsantwort (Asahina *et al.*, 1995; Hosoi *et al.*, 1993). Die immunsuppressive Wirkung mancher Neuropeptide wurde auch in VPAC₂R^{-/-}-Mäusen bestätigt. Die VIP-Rezeptor defizienten Mäuse zeigen eine im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant stärkere DTH-Antwort (Goetzl *et al.*, 2001).

Desweiteren moduliert CGRP *in vitro* Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Immunzellen. Die β_1 -Integrin vermittelte Adhäsion von humanen T-Zellen an Fibronektin wird beispielsweise durch CGRP induziert, durch ein anderes Neuropeptid, Substanz P, jedoch verhindert. Dies zeigt, dass Neuropeptide durch positive und negative Effekte T-Zellen zu modulieren vermögen (Levite *et al.*, 1998). Bei unreifen Dendritischen Zellen induziert CGRP Chemotaxis, in reifen Dendritischen Zellen jedoch wird keine gerichtete Migration beobachtet. (Dunzendorfer *et al.*, 2001).

A.2 Die primäre Abwehr von Mikroorganismen durch das angeborene Immunsystem

Antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und Dendritische Zellen übernehmen zwei wichtige Aufgaben in der Abwehr von Mikroorganismen: Zum einen stellen sie die primäre Barriere gegen Pathogene dar und zum anderen bilden sie die Basis für die adaptive Immunabwehr. Der Erkennungsmechanismus des angeborenen Immunsystems beruht nicht, so wie im adaptiven Immunsystem, auf klonaler Expansion und Rezeptor *rearrangements* der Antigenspezifischen Zellen, sondern auf Interaktion von Rezeptoren mit hochkonservierten, invarianten mikrobiellen Strukturen, den *pathogen associated molecular patterns* (PAMP). Dies sind u.a. Lipopolysaccharide, Peptidoglykane oder Lipoteichonsäuren, die typisch sind für bestimmte Erregerklassen. Die grundlegende Unterscheidung zwischen mikrobiellen und körpereigenen Strukturen wird über die *pattern recognition Rezeptoren* erreicht (Akira, *et al.*, 2003; Häcker *et al.*, 1999; Holzmann *et al.*, 2003; Fearon *et al.*, 1997).

Besonders die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung hinzugewonnen, da ihnen eine zentrale Rolle in der Erkennung mikrobieller Strukturen und in der Umsetzung zellulärer Signale zugeordnet wird. Das Protein Toll wurde in Insekten identifiziert, das als Rezeptor eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen Pilzinfektionen spielt (Lemaitre *et al.*, 1996). In *Mammalia* wurden später homologe Proteine von Toll gefunden, die TLRs (Medzhitov *et al.*, 1997). Die Familie der TLRs umfasst nach dem heutigen Kenntnisstand zehn Mitglieder, die unterschiedliche mikrobielle Strukturen erkennen (Abbildung 2). Die TLRs gehören zur Superfamilie der Interleukin-1 Rezeptoren (IL-

1R), die in ihrer zytoplasmatischen Domäne signifikante Homologien aufweisen. Vor allem ist dies ein Bereich von etwa 200 Aminosäuren, der als Toll/IL-1R- (TIR-) Domäne bezeichnet wird. Die TLRs unterscheiden sich vor allem in ihrer extrazellulären Region, wobei diese stets Leucinreiche *repeats* (LRR) aufweist, die vermutlich an der Erkennung von Pathogenen beteiligt sind.

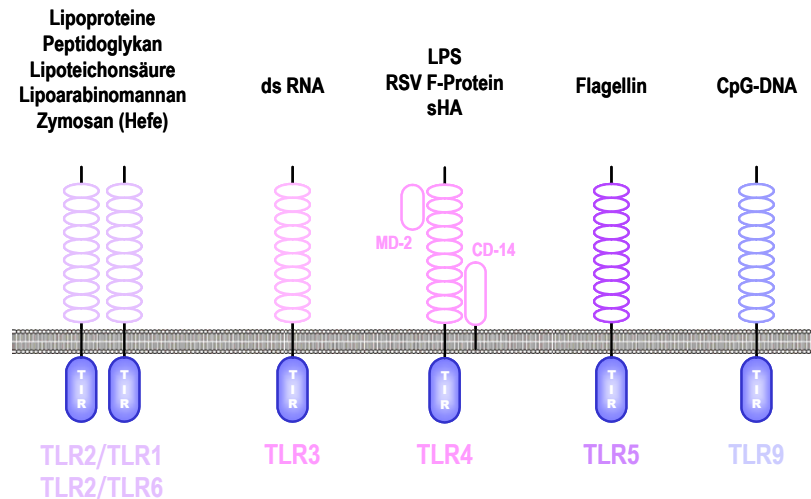


Abbildung 2: Die TLR-Familie und ihre Liganden

Die Signaltransduktion der TLRs erfolgt über zwei Wege, die die Adaptorproteine MyD88 bzw. TRIF als zentrale Moleküle einschließen.

Die Signaltransduktion aller bekannten TLRs verläuft über das Adaptormolekül MyD88 und involviert die IL1R-associated protein kinase (IRAK), die transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase (TAK1), das TAK1 binding protein-1 (TAB1) und -2 (TAB2) und den TNF-receptor associated factor 6 (TRAF6). Einen Überblick über den heutigen Kenntnisstand der MyD88-abhängigen TLR-Signaltransduktion gibt Abbildung 3.

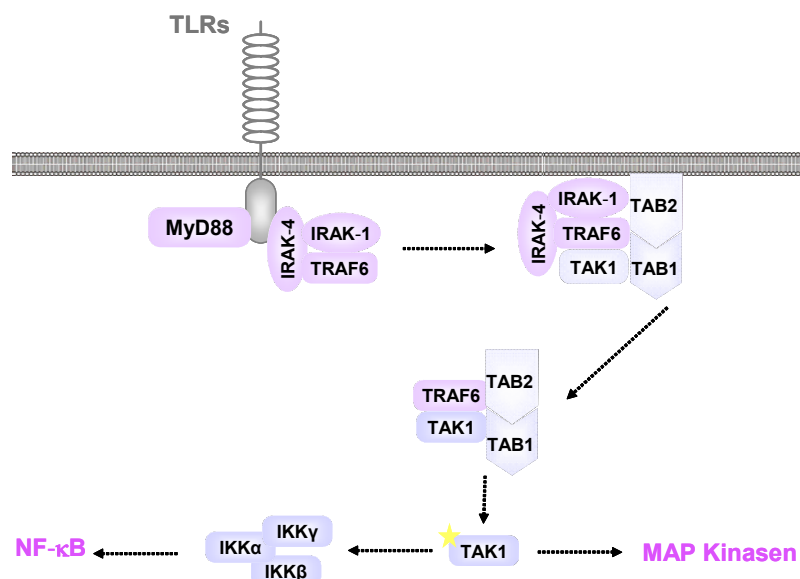


Abbildung 3: MyD88-abhängige TLR-Signaltransduktion

Nach Aktivierung durch PAMPs rekrutieren die TLRs das Adaptorprotein MyD88 an den Rezeptorkomplex. Dies führt zur Assoziation des Rezeptors mit den Kinasen IRAK-1 und -4. Durch die Interaktion wird IRAK-1 phosphoryliert und induziert die Anlagerung von TRAF6 an den Rezeptorkomplex (Cao *et al.*, 1996a; Cao *et al.*, 1996b; Janssens *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002). Die Assoziation von IRAK-4—IRAK-1—TRAF6 führt zu Konformationsänderungen des Komplexes wodurch dieser von TLRs dissoziiert und an der Zytoplasmamembran mit einem zweiten membranständigen Komplex interagiert. Dieser besteht aus TAK1, TAB-1 und TAB-2. Durch Interaktionen beider Komplexe werden TAB-2 und TAK1 phosphoryliert und translozieren zusammen mit TRAF6 und TAB-1 ins Zytoplasma. TAK1 aktiviert den I κ B-Kinase (IKK) α — β — γ -Komplex (Jiang *et al.*, 2002; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Inaktive IKK stabilisiert den Transkriptionsfaktor *nuklear factor κ B* (NF- κ B) im Zytoplasma. Phosphorylierung von I κ B- α durch IKK führt zu deren Degradierung und ermöglicht so die Translokation von NF- κ B in den Nukleus und damit die Transkription von Genen.

Die Aktivierung von TAK1 resultiert neben der Aktivierung von NF- κ B auch in der Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAP Kinasen). Diese setzen die über TLRs detektierten extrazelluläre Signale in intrazelluläre Signale um. Es sind drei MAPK Signaltransduktionswege bekannt, die über *extracellular signal-regulated kinases 1 und 2* (ERK1,2), *c-jun-N-terminal kinase 1* (JNK1) und p38 vermittelt werden. ERK1,2, JNK1 und p38 werden durch duale Phosphorylierung von Thr- und Tyr-Resten über MAPK Kinasen (MAPKK) aktiviert. Die MAPKK wiederum werden über Ser/Thr-Kinasen aktiviert, die sogenannten MAPKK Kinasen (MAPKKK). Die Substrate aktivierter MAPK sind zytosolische Proteine und Transkriptionsfaktoren, über die Prozesse wie Apoptose, Proliferation und die Expression von Genen reguliert werden (Kumar *et al.*, 2003). Tak1 ist eine MAPKKK, die MKK6 phosphoryliert und so p38 aktiviert (Wang *et al.*, 2001).

Die Analyse MyD88-defizienter Makrophagen machte deutlich, dass neben dem über MyD88-vermittelten Signaltransduktionsweg ein zweiter, von MyD88 unabhängiger Weg besteht. LPS aktivierte in MyD88^{-/-}-Makrophagen MAP Kinasen und NF- κ B, wenngleich die Aktivierung erst zu einem späteren Zeitpunkt als in den Wildtyp-Makrophagen erfolgte. Bei der MyD88-unabhängigen Signaltransduktion von TLR3 und TLR4 spielen die Adaptormoleküle TRAM und TRIF eine zentrale Rolle. TRIF kann entweder mit TRAF6 (Yamamoto *et al.*, 2002) oder mit der *Tank-binding kinase* (TBK-1) interagieren. TBK-1 aktiviert zusammen mit IKK ϵ den Transkriptionsfaktor *interferon-regulatory factor-3* (IRF-3), der entscheidend ist für die IFN- β -Expression (Kawai *et al.*, 2001; Fitzgerald *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2003). IFN- β induziert STAT-1-abhängig die Expression von Chemokinen, wie IP-10 und MCP-1 (Kopydlowski *et al.*, 1999). Über TRAF6 kann TRIF auch, ähnlich wie im MyD88-abhängigen Weg, NF- κ B aktivieren. Über TRAF6 und TBK-1 kann TRIF also zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren und so die Transkription unterschiedlicher Gene induzieren (Sato *et al.*, 2003) (Abbildung 4).

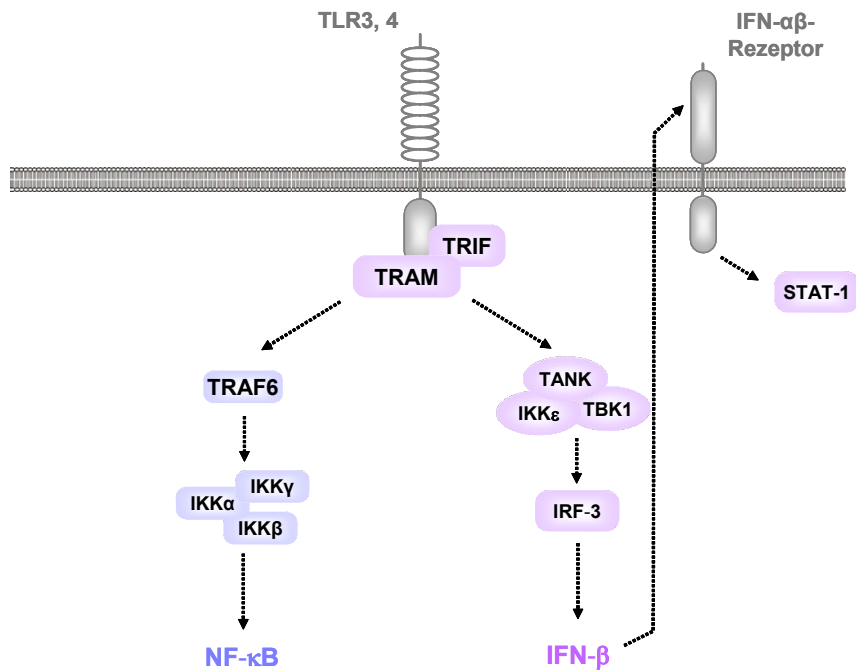


Abbildung 4: MyD88-unabhängige TLR-Signaltransduktion über TRIF

Schlussendlich führt die Aktivierung von Zellen über die TLRs zur Expression zahlreicher Gene, v.a. von Chemokinen und Zytokinen, die einer schnellen Infektionsabwehr dienen. Interessanterweise ist die Aktivierung von Zellen über bestimmte TLRs abhängig vom Zelltyp. So resultiert die Aktivierung von Zellen in der Expression definierter Zytokinmuster. Für Makrophagen und DC wurde gezeigt, dass sie nach Stimulation mit CpG-DNA unterschiedliche Mengen an IL-12 produzieren, wobei die, im Vergleich zu DC in Makrophagen stärker ausgeprägte Aktivierung der MAP-Kinase ERK 1,2, die IL-12-Produktion hemmt. (Häcker *et al.*, 1999).

A.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind sowohl Sensoren als auch Boten im Frühwarnsystem des Körpers gegen eindringende Pathogene. Dabei nehmen sie Antigene auf und aktivieren T-Zellen, indem sie ihnen die prozessierten Antigene präsentieren.

Dendritische Zellen sind durch die Expression von *pattern recognition Rezeptoren* und spezieller Enzyme, die Antigene in immunogene Peptide degradieren, gekennzeichnet. Sobald sie körperfremde Antigene erkannt und aufgenommen haben, reifen die Dendritischen Zellen und migrieren in die T-Zell Regionen von Lymphknoten und Milz, so dass die körperfremden Peptide in die Nähe der T-Zellen transportiert werden. Über MHC Klasse I oder II Moleküle werden die Antigenfragmente an die Zelloberfläche gebunden und den T-Zellen präsentiert. Reife Dendritische Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle (z.B. B7-1, B7-2), Adhäsionsmoleküle (z.B. LFA-1, CD49d, ICAM-1) und Zytokine (z.B. IFN-α/β, IL-10, IL-12), mit Hilfe derer

sie Th1 oder Th2-Antworten steuern (Moser *et al.*, 2000), die zu zellulären und humoralen Immunantworten führen. Auf diese Weise schaffen die Dendritischen Zellen eine Verbindung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität (Abbildung 5).

Eine Reihe anderer Zellen, wie z.B Makrophagen, präsentieren zwar auch Antigene an T-Zellen, dennoch können nur die Dendritischen Zellen effizient naive T-Zellen aktivieren. Deswegen werden sie auch als professionelle Antigenpräsentierende Zellen bezeichnet.

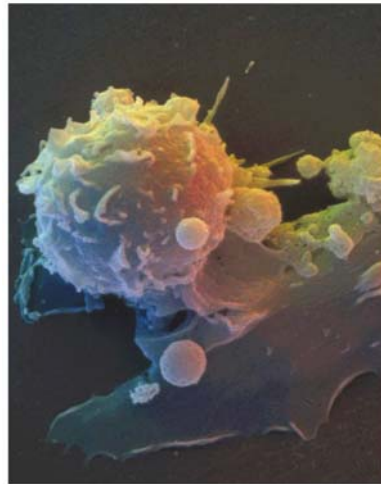


Abbildung 5: Interaktion von einer T-Zelle (oben links) mit einer Dendritischen Zelle (aus Yewdell, et al., 2002)

Dendritische Zellen stammen von einem Knochenmarksprogenitor ab. Sie unterteilen sich in mehrere Subtypen, deren Differenzierung unklar ist und die über verschiedene Modelle erklärt werden. Nach dem *functional plasticity model* sind die DC Subtypen verschiedene Aktivierungsstadien einer Lineage. Die unterschiedliche Funktionalität der Subtypen beruht auf lokalen Signalen. Das *specialized lineage model* dagegen propagiert die Entwicklung der DC Subtypen aus separaten Entwicklungslinien, wobei bestimmte Signale die Differenzierung der DC Vorläuferzelle zu den DC Varianten steuern (Shortman *et al.*, 2002). Klassischerweise werden murine Dendritische Zellen in die lymphoiden, myeloiden und plasmazytoiden DC eingeteilt, wobei die Präfixe keine Aussage über den hämatopoetischen Ursprung der Zellen machen. Alle murinen DC Subtypen exprimieren CD11c, unterscheiden sich aber in der Expression weiterer Oberflächenmarker, in der Sekretion von Zytokinen, der Aktivierung einer T-Zell-Antwort und der Verteilung in lymphoiden Geweben (vgl. Tabelle A-1).

LYMPHOIDE DC

Lymphoide DC exprimieren große Mengen an CD8 und CD205. Sie werden vor allem im Thymus, aber auch in der Milz und in den Lymphknoten gefunden (Shortman *et al.*, 2002). Nach Aktivierung über mikrobielle oder T-Zell Stimuli produzieren sie vor allem IL-12 (Belz *et al.*, 2002).

MYELOIDE DC

Myeloide DC exprimieren charakteristischerweise CD11b. Weiterhin werden Subtypen innerhalb der myeloiden DC unterschieden, die sich hinsichtlich ihrer Expression von CD4 und CD205 unterscheiden. Sie sind in Milz und Lymphknoten lokalisiert. (Shortman *et al.*, 2002). Nach Aktivierung produzieren sie vor allem IFN- γ (Belz *et al.*, 2002).

PLASMAZYTOTOIDE DC

Plasmazytoide DC exprimieren typischerweise große Mengen an CD45RA. Im Unterschied zu den beiden anderen DC Subtypen, die TLR 2, 3, 4 und 9 exprimieren, weisen sie nur die TLRs 7 und 9 auf. Sie grenzen sich klar von den beiden anderen DC Subtypen durch die Produktion großer Mengen von Typ 1 Interferonen und IL-6 als Reaktion auf Aktivierung mit viralen Komponenten ab (Belz *et al.*, 2002; Hochrein *et al.*, 2002).

LANGERHANS ZELLEN

Langerhans Zellen werden auf Grund ihres Kompartiments auch als Dendritische Zellen der Haut bezeichnet. Sie exprimieren die Oberflächenmarker CD11b, CD8 und CD205 (Belz *et al.*, 2002).

<i>DC Subtyp</i>	<i>Oberflächenmarker</i>	<i>typische Zytokine</i>
Lymphoide DC	CD8 ⁺ CD205 ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁺	IL-12
Myeloide DC	CD4 ⁺ /CD8 ⁻ CD205 ⁺ /CD11b ⁺ CD11c ⁺	IFN- γ
Plasmazytoide DC	CD45RA ⁺ B220 ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁺	IFN- α/β
Langerhans Zellen	CD8 ⁺ CD205 ⁺ CD11b ⁺	

Tabelle A-1

A.2.2 Verbindung zwischen Neuropeptiden und dem angeborenen Immunsystem

Sensorische Neuropeptide werden im zentralen und peripheren Nervensystem produziert. Substanz P, CGRP, VIP und Sekretoneurin stellen eine Gruppe von Neuropeptiden dar, die von Nervenfasern in neurogenen Entzündungsreaktionen ausgeschüttet werden und als entscheidende Mediatoren inflammatorischer und immunologischer Prozesse angesehen werden (Payan *et al.*, 1989). Solche Neuropeptid ausschüttenden Nervenfasern sind häufig direkt mit Immunzellen und lymphoiden Organen assoziiert (Stevens-Felten *et al.*, 1997). So exprimieren Lymphozyten, Monozyten und andere Immunzellen Rezeptoren für Neuropeptide und werden durch diese aktiviert (Nong *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1997; Torii *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998).

Die enge Assoziation von Nervensystem und Immunsystem kann durch eosinophile Granulozyten vermittelt werden. Sie weisen, neben Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen eine initiale, unspezifische Reaktion auf Antigene auf und initiieren darauffolgend eine spezifische Immunantwort seitens der Lymphozyten. Neuropeptide können all diese Zellen beeinflussen und verbinden so das Nerven- und das Immunsystem (Herbert *et al.*, 2000).

Für Langerhans Zellen, den Dendritischen Zellen der Haut, wurde gezeigt, dass sie in der Epidermis in direktem anatomischen Kontakt mit CGRP-haltigen-Nervenfasern stehen (Abbildung 6). Die Funktion von CGRP als neurologischer Mediator in Langerhans Zellen spiegelt sich in einer verminderten DTH-Antwort in BALB/c-Mäusen, nach Präinkubation der Stimulatorzellen mit CGRP wieder. Vermutlich supprimiert CGRP die Antigenpräsentation in den Langerhans Zellen (Hosoi *et al.*, 1993). Unterstützt wird diese Annahme durch die Herunterregulierung des kostimulatorischen Moleküls B7-2 in der Langerhans-Zelllinie XS52 nach Aktivierung mit LPS und GM-CSF. Die Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 wurde dagegen hochreguliert (Torii *et al.*, 1997; Asahina *et al.*, 1995).

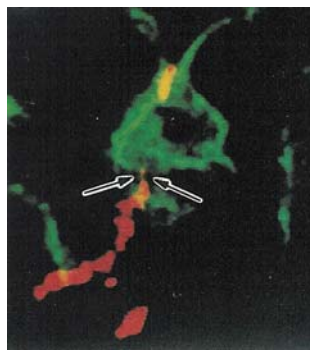


Abbildung 6: Kontakt einer CD1a⁺-Epidermiszelle (Langerhans Zellen) und einer CGRP⁺-Nervenfasern (aus Hosoi *et al.*, 1993)

Humane *ex vivo* DC, generiert aus peripheren mononukleären Zellen, bestätigen die Verknüpfung von Nerven- und Immunsystem. In unreifen Dendritischen Zellen induzierten Neuropeptide wie CGRP, VIP und Sekretin Chemotaxis. In reifen Dendritischen Zellen dagegen wurde keine gerichtete Migration beobachtet. Dies spiegelt möglicherweise eine Situation wieder, in der unreife Dendritische Zellen zum Ort der Entzündung wandern, während reife Dendritische Zellen am Ort der Entzündung bleiben (Dunzendorfer *et al.*, 2001).

A.3 Ziele dieser Arbeit

Neuropeptide sind in den Verlauf der Hämatopoese involviert. Insbesondere für das Neuropeptid CGRP wurde ein stimulatorischer Effekt auf myeloide Progenitorzellen des Knochenmarks gezeigt (Broome *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von CGRP und dessen Rezeptorkomplex, der aus CRLR, RAMP-1 und CGRP-RCP besteht, in der Hämatopoese untersucht. Dabei wird ihre Bedeutung mittels eines *in vitro* Systems untersucht, in dem humane CD34⁺-Stammzellen zu Granulozyten differenziert werden.

CGRP und dessen Rezeptor spielen eine wichtige Rolle im Microenvironment des Knochenmarks. Da von Riedl (2000) gezeigt wurde, dass T- und B-Zell-Lymphomzelllinien RAMP-1 und CRLR exprimieren, und dass Knochenmarksstromazellen mit der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 interagieren, könnten eine Interaktion von RAMP-1 und Knochenmarksstromazellen das Überdauern von Lymphomzellen im Knochenmark begünstigen. Dieses Phänomen wird in der *tumor dormancy* beobachtet, die durch ein Überdauern von Tumorzellen in klinisch unauffälligen Patienten charakterisiert ist. In der vorliegenden Arbeit werden die molekularen Mechanismen anhand eines Tiermodells überprüft. Die Lymphomzelllinien KM und LCI, unterscheiden sich durch ihre Persistenz bzw. Nicht-Persistenz im Knochenmark. Über den Einfluss der CGRP-Rezeptorexpression und die Zell-Zellinteraktionen wird die Bedeutung des CGRP-Rezeptors in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark untersucht.

Das Neuropeptid CGRP vermittelt in neuro-immunologischen Kommunikationen vor allem immunsuppressive Effekte. In der vorliegenden Arbeit wird der direkte Einfluss von CGRP auf die Immunfunktion Antigenpräsentierender Zellen (verschiedene DC-Subtypen und Peritonealmakrophagen) untersucht. Dabei werden sowohl die Zytokin- bzw. Chemokinproduktion als read-out einer schnellen Immunantwort gemessen, als auch die molekularen Mechanismen, über die die Sekretion der Botenstoffe reguliert werden, untersucht.

B: Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Bezugsquellennachweis

B1.1.1 Chemikalien

<i>Chemikalien</i>	<i>Bezugsquellen</i>
Acrylamidlösung (30% Acrylamid; 0,8% N,N' Methylbisacrylamid)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose (Ultrapure)	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Biorad, München
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol (98%)	Sigma, Taufkirchen
Brefeldin A (Golgi Plug™)	BD Biosciences, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, Taufkirchen
Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	Bachem, Heidelberg
CGRP-Antagonist (CGRP ₈₋₃₇)	Bachem, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue	Sigma, Taufkirchen
CpG 2216	TIB, Berlin
dNTP's	Eurogentec, Belgien
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Erythropoetin (EPO) (human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Ficoll	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Sigma, Taufkirchen
G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor, human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor, human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor, murin, rekombinant)	TEBU-Bio, Offenbach
HEPES	Sigma, Taufkirchen

3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma, Taufkirchen
Interleukin-3 (human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Interleukin-3 (murin, rekombinant)	Sigma, Taufkirchen
Interleukin-6 (human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Insulin (aus bovinem Pankreas)	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Lipopolysaccharid	Sigma, Taufkirchen
Methylenblau	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Fluka, Ulm
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat (Trihydrat)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma, Taufkirchen
Pam-3-Cys (Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein)	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Pertussis Toxin	Sigma, Taufkirchen
pIC (Polyinosinic-Polycytidylic Acid)	Sigma, Taufkirchen
Prostaglandin E2	Sigma, Taufkirchen
Protease Inhibitor Complete Mini	Roche, Mannheim
Random Primers	Invitrogen, Karlsruhe
SCF (stem cell factor, human, rekombinant)	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Salmon Sperm DNA	Sigma, Taufkirchen
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Temed	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle B-1

B.1.1.2 Enzyme

<i>Enzyme</i>	<i>Bezugsquellen</i>
Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Klenow Polymerase	Roche, Mannheim

MATERIAL UND METHODEN

Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Rediprime™II Random priming labelling system	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNAasin	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript II Plus Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

Tabelle B-2

B.1.1.3 Radiochemikalien

Es wurde [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. Die verwendeten Radiochemikalien hatten eine spezifische Aktivität von $>3000 \text{ Ci/mmol}$ und wurden vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

B.1.1.4 Zellkulturmedien

Medien	Bezugsquellen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
FCS Gold	PAA, Linz, Österreich
FCS	ICN
G418	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Insulin	Sigma, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate buffered saline (PBS) w/o Mg^{2+} , Ca^{2+}	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640	Biochrom, Berlin
VLE RPMI 1640, Endotoxin $\leq 0,01 \text{ EU/ml}$	Biochrom, Berlin

Tabelle B-3

B.1.1.5 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Bezugsquellen</i>
3MM Whatman Filterpapier	GLW, Würzburg
Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit „Format A“	Biomol, Hamburg
Duo Set ELISA Development System (mouse IL-10, mouse TNF, mouse KC)	R&D Systems, Wiesbaden
ELISA Platten	Maxisorp, Nunc, Karlsruhe
Express Hyb-Hybridisierungslösung	Clontech, Palo Alto, USA
Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane	NEN Life Science Products, Boston, USA
Gel Purification Kit	Qiagen, Hilden
Hyperfilm (Röntgenfilme)	Amersham, Braunschweig
Magic Mark (Proteingrößenstandard)	Invitrogen, Karlsruhe
MACS immunomagnetische Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maxiprep Kit	Qiagen, Hilden
MicroAmp® Optical Tubes	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Caps	Applied Biosystems
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Plastikwaren	Falcon, New Jersey, USA
Protran Hybridisierungsmembran	Schleicher und Schuell, Dassel
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Größenstandard	Promega, Madison, USA
Smart Ladder (DNA Größenstandard)	Eurogentec, Belgien
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Western Lightning Enhanced Luminol Reagent	Perkin Elmer, Boston, USA

Tabelle B-4

B.1.1.6 Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Bezugsquellen</i>
Brutschrank	BB6220CU/CO ₂ , Kendro Laboratory Products GmbH, München
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Fischer Scientific, Ingolstadt
Elektrophoresekammer für	Biometra, Göttingen

Polyacrylamidgele	
ELISA-Reader	Dynatech MRX, Dynatech Laboratories
Durchflußzytometrie (Fluorescence-activated cell-sorter (FACS))	BD FACS Calibur, BD, Heidelberg
Kühlzentrifugen	Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau; Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Zeiss ID03, Zeiss, Jena
Nukleinsäuredetektion	Gel Doc 1000, Biorad, München
pH-Meter	Inolab pH Level 1, WTW, Weilheim
Photometer	Spectronic Genesys5, Spectronic Instruments
PhosphoImager	Storm 840, Molecular Dynamics, Krefeld
Proteintransfer	Transblot SD, Biorad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Schüttler	Celloshaker Variospeed, Cemetron Products, Biotec, Fischer
Sterilbank	Hersafe, Kendro Laboratory Products GmbH, München
Power Pack P25 (Stromquellen)	Biometra, Göttingen
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen; GeneAmp PCR System 9700; PE Applied Biosystems, Lincoln, Canada
Thermocycler für TaqMan	ABI Prism™ 7700 Sequence Detector
Tischzentrifugen	Picofuge, Heraeus, Hanau; Megafuge 2.0.R , Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	L8-70M Beckmann, München (Rotor SW 41)
UV-Crosslinker	UV Stratalinker®2400, Stratagene, Hamburg
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann Labor Technik

Tabelle B-5

B.1.2 Puffer und Lösungen

Ampicillin stock-Lösung

100 mg/ml

10x Ammoniumchloridlysepuffer

89,9 g NH_4Cl
10 g KHCO_3
370 mg tetraNatrium EDTA
ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

10% Ammoniumpersulfat (APS)

1g Ammoniumpersulfat in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Citratpuffer

8 ml 0,1 M Zitronensäure
17 ml 0,1 M Natriumcitrat
25 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

DEPC-H2O

0,1% DEPC in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, 12-24 h rühren und danach, zum Inaktivieren des nicht gebundenen DEPC, autoklavieren

DNA-Auftragspuffer

1 ml 10x TAE
1 ml Orange G (10 mg/ml)
5 ml Glyzerol
3 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2x HBS

8 g NaCl
6,5g HEPES
10 ml 76 mM NaH_2PO_4
pH 7,0 (sehr exakt)

Intrazelluläre Färbung-Waschpuffer

0,5% BSA
0,02% Natriumazid
in PBS

Intrazelluläre Färbung-Fixierungspuffer

2% Paraformaldehyd
in PBS

Intrazelluläre Färbung-Permeabilisierungspuffer

0,5% BSA
0,02% Natriumazid
0,5% Saponin
in PBS

Kanamycin Stock-Lösung

50 mg/ml in H₂O_{dd}

5x KCM

500 nM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

Methylenblau-Lösung

0,5 M Natriumacetat, pH 4,8
0,04% Methylenblau

200 mM Natrium-Orthovanadat

0,37 g Natriumorthovanadat
10 ml H₂O_{dd}
pH 10

um das Natriumorthovanadat zu hydratisieren, die Lösung kochen bis die Farbe von gelb nach farblos umschlägt
auf RT abkühlen lassen
pH 10 nachjustieren
wiederholen bis die Lösung farblos und der pH 10 stabil bleibt

Northern Blot-Waschlösung 1

2x SSC
0,05% SDS

Northern Blot-Waschlösung 2

0,1x SSC
0,1% SDS

RNA-Auftragspuffer

160 µl 10x RNA-Laufpuffer
80 µl Bromphenolblau (gesättigte Lösung)

720 µl Formamid
720 µl Formaldehyd
160 µl Glyzerol
120 µl H₂O_{dd}

10x RNA Laufpuffer

400 mM Natriumacetat, pH 4,8
20 mM EDTA, pH 8,0

Southern Blot-Hybridisierungspuffer

50 g Dextransulfat (Natriumsalz)
50 ml 10% SDS
423 ml H₂O_{dd}
30 min erwärmen
29 g NaCl

Southern Blot-Waschlösung A

2x SSC
1% SDS

Southern Blot-Waschlösung B

0,2x SSC
0,1% SDS

20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0

Strippinglösung

0,5% SDS

50x TAE

2 M Tris
0,5 M Eisessig
50 mM EDTA
pH 8,5

10x TBS

0,1 M Tris/HCl, pH 8,0

0,15 M NaCl
pH 8,0

10x TBST

500 mM NaCl
20 mM Tris-HCl pH 7,5
0,05% Tween20
pH 8,0

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 M EDTA, pH 8,0
pH 7,4

10x Tris-Glycin-SDS

150 g Tris/HCl pH 7,5
720 g Glycin
in 4 l H₂O_{dd} lösen
50 g SDS
ad 5 l H₂O_{dd}

TSB-Puffer (Transformation and Storage Buffer)

85% LB-Medium
5% DMSO
10% Polyethylenglykol 4000
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

2x SDS-Probenpuffer

5% Bromphenolblau
30% Saccharose
2% SDS
80 mM Tris-HCl, pH 6,8

Transblot

48 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,004% SDS

39 mM	Glycin
20%	Methanol

TNE

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA, pH 8,0

Zellysepuffer*Stock:*

1%	NP-40
1%	Triton-X-100
150 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,4
1 mM	EDTA

frisch zugeben:

10 mM	NaF
10 mM	Iodacetamid
20 mM	β -Glycerophosphat
1 mM	Na-Orthovanadat, pH 10 (s.o.)

Protease Inhibitor Complete Mini (Roche): 1 Tablette in 1 ml PBS auflösen, 1:10 einsetzen

B.1.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Mäusestämme**B.1.3.1 Bakterienstämme**

E.coli DH5 α	F-endA1, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, (argF-lac zya), U169, ϕ 80lacZ Δ M15
E.coli TOP10	F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1

B.1.3.2 Bakterielle Nährmedien***LB-Medium*** (Luria-Bertani-Medium)

10 g	Trypton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
	ad 1l H ₂ O, pH 7,0
für Platten: 15 g Agar/l	

Zur Kultivierung von diversen E. coli-Stämmen wurde LB-Medium verwendet. Abhängig von den Plasmiden wurde dem Medium nach dem Autoklavieren Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) zugegeben.

SOC-Medium

2,0% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgSO₄
 10 mM MgCl₂
 20 mM Glukose (nach dem Autoklavieren steril zugeben)
 pH 7,2

SOC-Medium wurde zur Anzucht von E.coli-Kulturen direkt nach der Transformation von Plasmiden verwendet.

B.1.3.3 Zelllinien

<i>Zelllinien</i>	<i>Herkunft/Eigenschaft</i>	<i>Referenz</i>
293T	humane embryonale Fibroblasten	ATCC, Rockville, USA
Esb	murine Lymphomzelllinie	V. Schirmmacher, DKFZ, Heidelberg
LB	murines T-Zell-Lymphom	Lugasi <i>et al.</i> , 1990
LCI 8934	isolierte Leber-metastasierende Esb-β-Gal-Lymphomzellen	V. Schirmmacher, DKFZ, Heidelberg
LCI sort.	isolierte Leber-metastasierende Esb-β-Gal-Lymphomzellen, gesortet auf β-Gal-hochexprimierende Zellen	V. Schirmmacher, DKFZ, Heidelberg
LCI-KM1	im Knochenmark persistierende Esb-β-Gal-Lymphomzellen	V. Schirmmacher, DKFZ, Heidelberg
LCI-KM2	im Knochenmark persistierende Esb-β-Gal-Lymphomzellen	V. Schirmmacher, DKFZ, Heidelberg
Phoenix	Maus ecotrope Retrovirus <i>producer line</i>	Grignani <i>et al.</i> , 1998
NIH-3T3	murine embryonale Fibroblasten	Jainchill <i>et al.</i> , 1969

Tabelle B-6

B.1.3.4 Kulturmedien

LCI, LCI sort., LCI-KM1, LCI-KM2

VLE RPMI 1640, 10% FCS Gold, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-ME, 0,5 mg/ml G418

NIH-3T3, Phoenix, 293T

DMEM, 10% FCS, 2 mM Glutamin, Penicillin-Streptomycin

LB

VLE RPMI 1640, 10% FCS, 2 mM Glutamin, 10 µg/ml Insulin

Knochenmarkszellen

VLE RPMI 1640 (Endotoxin < 0,01), 10% ICN FCS, 2 mM Glutamin, 0,05 mM 2-ME

Thioglykolat-Makrophagen

VLE RPMI 1640 (Endotoxin < 0,01), 10% ICN FCS, 2 mM Glutamin

B.1.3.5 Mäusestämme

<i>Mäusestämme</i>	<i>Bezugsquelle</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>
C57BL/6	Harlan-Winkelmann, Borcheln	6-10 Wochen	weiblich
Balb/c	Harlan-Winkelmann, Borcheln	6-8 Wochen	weiblich

Tabelle B-7

B.1.4 Vektoren

Für die Klonierung und zur Expression von DNA-Sequenzen wurden sowohl kommerzielle Vektoren eingesetzt, als auch Vektoren, die in der Arbeitsgruppe kloniert wurden.

<i>Vektoren</i>	<i>Eigenschaften</i>	<i>Referenzen</i>
MSCV MIGR I	Bicistronischer Expressionsvektor mit GFP-Kassette, enthält sowohl retrovirale, als auch prokaryontische Promotorregionen	1)
MSCV MIGRI/CATS	MSCV MIGRI mit cDNS-Insert von murinem Ramp-1	2)
pcDNA3.1	Phagemid-Vektor für prokaryontische Expression	3)
pcDNA3.1 IgG	abgeleitet vom pcDNA3.1, Expressionsvektor für die Expression von IgG-Fusionproteine	4)
pEGFP-N1	Expressionvektor für GFP	5)
pEF-GFP	Expressionvektor für GFP, abgeleitet von pEF-Sem und	6)

	pEGFP-N1	
pBK-CMV	Phagemidvektor für prokaryontische und eukaryontische Expression von Proteinen	7)
pBK-CMV-CATS-1	pBK-CMV mit der cDNS-Insert von murinem Ramp-1	8)
pBK-CMV-Ramp-1	pBK-CMV mit der cDNS-Insert von humanem Ramp-1	9)
pBK-CMV-mCRLR	pBK-CMV mit der cDNS-Insert von murinem CRLR	8)
pBK-CMV-mGAPDH	pBK-CMV mit der cDNS-Insert von murinem GAPDH	4)
pCR Blunt	Klonierungsvektor für PCR-Produkte; (ZeroBlunt™ PCR Cloning Kit)	3)
pGEM Teasy	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	10)
pGEM Teasy-hCGRP-RCP	pGEM Teasy-hCGRP-RCP mit cDNS von humanem RCP	11)

Tabelle B-8

Referenzen:

- 1) Cornelius Miething, III. Med.Klinik, Klinikum rechts der Isar, München
- 2) M. Harzenetter, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München
- 3) Invitrogen, Karlsruhe
- 4) A.B. Winkler, A.Lifka, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München
- 5) Clontech, Palo Alto, USA
- 6) H. Häcker, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München
- 7) Stratagene, Heidelberg
- 8) C. Riedl, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München
- 9) B. Neumann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München
- 10) Promega, Madison, USA
- 11) A. Schuster, Institut für Medizinische Mikrobiologie, TU München

B.1.5 Antikörper

B.1.5.1 Erstantikörper und Überstände

<i>Antikörper</i>	<i>Referenz</i>
Maus IgG _{2a} gegen murines i-Ad MHC II Alloantigen	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines β7-Integrin	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2b} gegen murines αm-Integrin	BD Biosciences, Heidelberg
armenischer Hamster, IgG gegen murines	BD Biosciences, Heidelberg

α x-Integrin

Ratte gegen Fc-Rezeptor	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster, IgG gegen murines β 1-Integrin	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2b} gegen murines CD44	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines B220	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG _{2b} gegen murines CD45RA	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines α 4-Integrin	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines B7.1	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines B7.2	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines Thy1.2	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG _{2b} gegen c-kit	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2b} gegen murines Ly 6G	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG gegen murines ICAM-1	BD Biosciences, Heidelberg
Kanninchen IgG gegen murines I κ B- α	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Kanninchen, IgG, polyclonal	Santa Cruz Biotechnology
Kanninchen, IgG, polyclonal	Abcam
Ratte, IgG _{2a} gegen murines ICAM-2	BD Biosciences, Heidelberg
Maus IgG _{2a} gegen murines i-Ab MHC II Alloantigen	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster IgG gegen murines α E	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte, IgG _{2a} gegen murines LFA-1	
Maus IgG _{2a} gegen murines L-Selektin	Gallatin, W.M. et al., 1983
Kanninchen IgG ₁ gegen murine p38 MAP Kinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Kanninchen IgG ₁ gegen murine p38 MAP Kinase, phosphoryliert an Thr180/Tyr182	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Kanninchen IgG ₁ gegen murine p44/p42 (ERK1,2) MAP Kinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Kanninchen IgG ₁ gegen murine p44/p42 (ERK1,2) MAP Kinase, phosphoryliert an Thr202/Tyr204	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Ratte IgG1 gegen murines TNF- α	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle B-9

Die Antikörper wurden als Hybridomüberstand oder in gereinigter Form , FITC-, PE- oder Biotin-markiert eingesetzt.

B.1.5.2 Zweitantikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Referenz</i>
Ziege Anti gegen Kanninchen IgG, Peroxidase	New England Biolabs
Kanninchen IgG markiert	GmbH, Frankfurt
Ziege anti Ratte gegen Ratten IgG, FITC-markiert	Dianova, Hamburg
IgG (H+L)	
anti Hamster IgG gegen hamster IgG, FITC-markiert	Dianova, Hamburg

Tabelle B-10

B.1.5.3 Isotypkontrollen

<i>Antikörper</i>	<i>Referenz</i>
Hamster IgG ₁ Gruppe 1 κ Isotyp Standard	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG _{2a} Isotyp Standard	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG _{2b} Isotyp Standard	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle B-11

Die Antikörper wurden FITC oder PE-markiert eingesetzt.

B.2 Zellbiologische Methoden

B.2.1 Kultivierung von Zelllinien

B.2.1.1 Suspensions-Zelllinien

Suspensionszellen wurden in einer Dichte bis ca. 5×10^5 Zellen/ml bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 7% CO₂ kultiviert.

B.2.1.2 Adhärenz wachsende Zelllinien

Adhärenz Zelllinien wurden unter gleichen Bedingungen wie Suspensionszellen kultiviert. Das Umsetzen der Zellen erfolgte durch Ablösen mittels 0,05% Trypsin/EDTA. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in der gewünschten Dichte in Medium aufgenommen und ausgesät.

B.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen mit 0,2% Trypanblau und 0,9% NaCl in PBS in einer Neubauer Zählkammer.

B.2.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium setzte sich aus 90% FCS und 10% DMSO zusammen. Jeweils 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen und für 24 Stunden bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst rasch bei 37°C . Die Zellen wurden einmal mit vorgewärmtem Medium gewaschen und anschließend in Kulturmedium ausgesät.

B.2.2 Zellbiologische Methoden humaner Primärzellen

B.2.2.1 Isolierung von Granulozyten und CD34^+ -Zellen

Nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten wurde entweder Nabelschnurblut oder mit granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-mobilisiertes peripheres Blut von Patienten isoliert, welche autologe Stammzelltransplantationen gegen lymphoproliferative Erkrankungen erhielten. Die Aufreinigung der Granulozyten aus dem peripheren Blut erfolgte nach hypotoner Lyse der Erythrozyten und über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. CD34^+ -Progenitorzellen wurden über immunomagnetische Beads aufgereinigt. Der Anteil der CD34^+ -Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft und die Reinheit lag stets zwischen 87 und 98%.

B.2.2.2 *In vitro* Granulopoese von CD34^+ -Zellen

CD34^+ -Zellen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO_2 in folgendem Medium gehalten:

RPMI 1640 Medium, 10 mM HEPES, nicht essentielle Aminosäuren, 10^{-4} M 2-ME, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 10 U/ml Penicillin/Streptomycin, 10% FCS.

1- bis 2-mal pro Woche wurde die Hälfte des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt.

Myeloide Differenzierung wurde durch Zugabe von 25 ng/ml rekombinantem humanen Stammzellfaktor (SCF) und 200 ng/ml G-CSF, für die angegebenen Zeiträume, induziert.

B.2.2.3 *Clonal Colony Assays*

Frisch isolierte humane CD34^+ -Zellen wurden in einer Dichte von 250 Zellen pro 1 ml Methylzellulose auf 35 cm^2 Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO_2 ausplattiert. Der Methylzellulose wurden 30% FCS, 1% BSA, 10^{-4} M 2-ME, 2 mM L-Glutamin und humane Zytokine zugegeben. Die Zytokine wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

SCF	50 ng/ml
GM-CSF	20 ng/ml
G-CSF	20 ng/ml
IL-3	20 ng/ml
IL-6	20 ng/ml
EPO	3 u/ml

Nach 14 Tagen Kultur wurde die Anzahl erythroider (BFU-E), granulomonozytischer (CFU-GM) und gemischter Kolonien bestimmt. Dazu wurden die Kolonien anhand ihrer morphologischen Kriterien analysiert, unter Verwendung eines inversen Mikroskops.

B.2.3 Isolierung muriner Primärzellen

B.2.3.1 Präparation von Knochenmarkszellen

Knochenmarkszellen wurden erhalten, indem Femur und Tibia von C57BL/6-Mäusen mit RPMI Medium, unter Verwendung einer 23-gauge Kanüle, durchgespült wurden. Die Erythrozyten wurden in Ammoniumchlorid hypotonisch lysiert.

Zur Generierung von plasmazytoiden Dendritischen Zellen wurden die übrigen Zellen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium in Kultur genommen und mit 200 ng/ml FLT3-Ligand differenziert. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Dendritischen Zellen erfolgte über 10 Tage bei 37°C und 7% CO₂. Plasmazytoide Dendritischen Zellen exprimieren CD11c und CD45RA und können so von myeloiden und lymphoiden Dendritischen Zellen der Kultur unterschieden werden. Plasmazytoide Dendritischen Zellen wurden durch Sortieren der Zellpopulation im Moflo erhalten.

Myeloide Dendritische Zellen wurden durch Differenzierung mit dem Zytokin GM-CSF generiert. Nach der Knochenmarkspräparation wurden 5×10^5 Zellen pro ml Medium ausgesät und mit 20 µg/ml GM-CSF für 11 Tage in Kultur genommen, wobei am Tag 3, 6 und 8 ein Teil des Mediums durch frisches ersetzt und erneut GM-CSF zugegeben wurde. Bei der Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Dendritischen Zellen bilden sich charakteristischer Weise Cluster aus.

Am Tag 11 der Kultur wurde der Überstand abgenommen und der Anteil der myeloiden Dendritischen Zellen wurde im FACS anhand der Expression von CD11c und CD11b festgestellt.

B.2.3.2 Präparation von Milzzellen

Nach dem Explantieren der Milzen wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, indem sie durch ein Nylon-Zellsieb gedrückt wurden. Die Erythrozyten wurden in Ammoniumchlorid hypotonisch lysiert.

B.2.3.3 Präparation von Leukozyten

Narkotisierten Mäusen wurde über die Augenvene peripheres Blut entnommen. Durch Zugabe von 100 µl Heparin wurde die Koagulation des Blutes verhindert. Nachdem die Zellen bei 6000 Upm in einer Tischzentrifuge pelletiert wurden, wurden die Erythrozyten in Ammoniumchlorid hypotonisch lysiert.

B.2.3.4 Präparation von Thioglykollat-induzierten Peritonealmakrophagen

Vier Tage nach Injektion von 800 µl Thioglykollat, wurde die Peritonealhöhle von C57BL/6-Mäusen mit 10 ml PBS gespült, um die in die Bauchhöhle rekrutierten Makrophagen und Granulozyten zu isolieren. Dazu wurde eine Spritze mit einer 19G Kanüle verwendet.

Nach hypotoner Lyse der Erythrozyten wurde die Zellen gewaschen und zur Aufreinigung der Makrophagen in RPMI-Medium ausgesät, und für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Adhärente Makrophagen wurden mittels eines Zellschabers von der Platte gelöst.

B.2.4 Durchflusszytometrie (FACS-Scan)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können mittels spezifischer Antikörper definierte Antigene auf der Oberfläche von Zellen, oder nach Permeabilisierung, im Zellinneren nachgewiesen werden.

B.2.4.1 Oberflächenfärbung

Pro FACS-Färbung wurden 1×10^5 Zellen verwendet, die zunächst in 100 µl CD16/32 (Fc-Block) (1:200) aufgenommen wurden. Dann wurden die Zellen einmal gewaschen und in 100 µl PBS mit dem Erstantikörper (1 µg) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers in der gewünschten Konzentration. Die Zellen wurden für weitere 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, bevor zunächst zweimal mit PBS, dann einmal mit PBS/1% BSA gewaschen wurde und die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen wurden. Häufig erfolgte eine direkte Färbung mittels eines markierten Primärantikörpers. Die gefärbten Zellen wurden im FACS-Scan analysiert.

B.2.4.2 Intrazelluläre Färbung

Nach dem Ernten der Zellen wurden diese zwei mal mit Waschpuffer gewaschen. Entweder wurden die Zellen zunächst an der Oberfläche gefärbt oder sofort in 1 ml Fixierungspuffer für 20 Minuten fixiert. Nachdem die Zellen einmal in Waschpuffer gewaschen wurden, wurden sie

in 200 bis 300 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen und 25 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert.

Für die Intrazelluläre Färbung wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 in Permeabilisierungspuffer eingesetzt und 25 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend wurden die Zellen noch zwei mal in Permeabilisierungspuffer gewaschen und aufgenommen. Die gefärbten Zellen wurden im FACS-Scan analysiert.

B.2.5 Zellsortierung im Hochleistungsdurchflusszytometer MoFlo

Mit Hilfe des MoFlo können Zellen auf Grund der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle separiert werden. Hierfür wurden die Zellen wie unter B.2.4.1 beschrieben gefärbt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml in PBS/Propidiumjodid (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgenommen. Direkt vor dem Sortieren wurde mittels eines Zellsiebes (60 µm) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die gesorteten Zellen wurden in Medium aufgenommen und entweder wieder in Kultur genommen und expandiert oder für weitere Experimente stimuliert.

B.2.6 Nachweis von cAMP

Zum Nachweis von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde der inverse ELISA „Cyclic AMP Enzyme Immunassay Kit Format A“ verwendet.

Pro Stimulationsansatz wurden 1×10^6 Zellen einmal in PBS gewaschen und dann in 1 ml PBS aufgenommen. Um die Spaltung des Phosphatesters zu verhindern, und somit den Abbau des Nukleosidzyklophosphats, wurde die endogene Phosphodiesterase der Zellen durch 30 minütige Inkubation mit 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) inhibiert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit 100 nM CGRP für die angegebenen Zeiträume stimuliert oder sie wurden mit 1 µM des CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ für 5 Minuten vorstimuliert und dann mit 10 nM CGRP stimuliert. Die Stimulation wurde durch sofortige Inkubation auf Eis gestoppt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 2500 Upm, wurde das Zellpellet in 150 µl 0,1 M HCl 10 Minuten lysiert. Die lysierten Zellen wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand wurde, nach Stabilisierung des synthetisierten cAMP durch Acetylierung, für die cAMP-Messung eingesetzt. Der ELISA wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

B.2.7 Nachweis von Chemokinen und Zytokinen mittels ELISA

Zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen wurden ELISA verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Die Überstände wurden in einer

Verdünnung von 1:2 (Zytokine) bzw. 1:5 (Chemokine) eingesetzt. Die ELISA wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

B.3 Proteinanalytische Methoden

B.3.1 Aufbereitung der Proben

Zur Western Blot Analyse wurden pro Spur $1-5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst in 25 μ l Zellysepuffer bei 4°C 15 Minuten lysiert. Dann wurden die Zellmembranen, Zytoskelettbestandteile und Nuklei bei 14 000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert, wobei die Proteine in Lösung verblieben. Der Überstand wurde mit 15 μ l 2x SDS Probenpuffer/2-Mercaptoethanol versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren.

B.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und zur Begrädigung mit einem Butanol/H₂O-Gemisch (Verhältnis 1:2) überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Alkoholgemisch durch mehrmaliges Waschen mit H₂O entfernt und das Sammelgel gegossen, in das sofort der Probenkamm eingesetzt wurde. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Platten in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer mit 2-Mercaptoethanol aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Gels aufgetragen. Parallel wurde ein Molekulargewichtsmarker zur späteren Größenbestimmung der Proteinbanden aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA bis das Bromphenolblau des Probenpuffers die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

10% Trenngel

6,7 ml	Acrylamidlösung
5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
4 ml	H ₂ O _{dd}
230 μ l	10% SDS
30 μ l	10% APS
11,4 μ l	TEMED

Sammelgel

1 ml	Acrylamidlösung
2,5 ml	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
6,3 ml	H ₂ O _{dd}
100 µl	10% SDS
100 µl	10% APS
5 µl	TEMED

B.3.3 Westernblot (Immunoblot)

Der Westernblot dient dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Im Anschluss an eine SDS-PAGE (vgl. B.3.2) wurde zunächst ein Elektro-Trockenblot mit einer „Semidry-Blotapparatur“ durchgeführt, um die Proteine auf eine Protranmembran zu überführen. Dazu wurden sechs Filter in Transblot getränkt und blasenfrei auf die Anode gelegt. Darauf folgte die, mit Transblot befeuchtete Protranmembran (Nitrocellulose), sowie das ebenfalls befeuchtete Gel. Den Abschluß bildeten sechs Filter, wiederum mit Transblot getränkt. Dann wurde die Kathode aufgesetzt, und die Proteine wurden für 1 Stunde bei 2 mA/cm² auf die Membran geblottet.

Für die Western Blot-Analyse wurde die Nitrocellulosemembran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 3% Magermilchpulver in TBS bzw. TBST geblockt. Danach wurde die Membran mit dem ersten Antikörper in 1,5% Magermilchpulver in TBS bzw. TBST 1,5 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf folgten drei Waschschriffe von jeweils 10 Minuten mit TBS bzw. TBST. Der zweite Antikörper, an Peroxidase gekoppelt, wurde ebenfalls in 1,5% Magermilchpulver in TBS oder TBST unter leichtem Schütteln für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde nochmals dreimal für 10 Minuten mit TBS bzw. TBST gewaschen.

Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Luziferase-ECL-Systems. Die Detektionslösungen eins und zwei (0,125 ml/cm² Membran) wurden zu gleichen Teilen gemischt. Die Membran wurde für eine Minute inkubiert und anschließend zwischen eine Plastikfolie gelegt. Die spezifischen Signale wurden mittels Röntgenfilm detektiert.

Die detektierten Signale wiesen folgende Größen auf:

Protein	Größe (kDa)
IκBα	41
p38	43
p38-P	43
p44/42	42, 44
p44/42-P	42, 44

Tabelle B-12

B.4 Molekularbiologische Methoden

B.4.1 Nachweis spezifischer mRNA in Zellen

B.4.1.1 Präparation von Gesamt-RNA

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurden mindestens 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellpellets wurden in 1 ml TRI-Reagent mit einer Kanüle homogenisiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde mit 200 μ l Chloroform versetzt, 15 Sekunden gevortext, 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C für 15 Minuten bei 12 000 g in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 500 μ l Isopropanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten bei 12 000 g) wurde das RNA-Pellet mit 75% igem Ethanol gewaschen, anschließend für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde in 100 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und für 10 Minuten bei 56°C gelöst.

B.4.1.2 Präparation von Gesamt-RNA mit RNeasy Mini (Quiagen)

Für die Präparation hochreiner RNA oder für die Präparation von RNA aus wenigen Zellen (mindestens 1×10^6 Zellen), wurde eine Isolierung über Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen und dann in RLT Puffer aufgenommen und gelöst:

<i>Zellzahl</i>	<i>RLT Puffer</i>
$< 5 \times 10^6$	350 μ l
5×10^6 bis 1×10^7	600 μ l
<i>Tabelle B-13</i>	

Die Probe wurde homogenisiert, indem das Lysat mindestens 5 mal durch eine 20-g Kanüle gezogen wurde. Die RNA wurde mit 350 μ l bzw. 600 μ l 70% igem Ethanol gefällt. Die Säule wurde mit 700 μ l Probe beladen und 15 Sekunden bei 10 000 Upm zentrifugiert. Die RNA wurde so an die Säule gebunden. Der restliche Puffer im Auffanggefäß wurde verworfen. Überschritt das Probenvolumen 700 μ l, so wurde der letzte Schritt wiederholt. Zunächst wurde die Säule mit 700 μ l Puffer RW1 gewaschen und dann zweimal mit 500 μ l Puffer RPE. Die RNA wurde mit 30 μ l DEPC-H₂O eluiert.

B.4.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm. Die optische Dichte von 1,0 entspricht einem RNA-Gehalt von 40 μ g/ml.

Die Reinheit der RNA lässt sich über den Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm berechnen. Bei reiner RNA liegt der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 (Maniatis *et al.*, 1982).

B.4.2.4 Agarosegel zur Überprüfung der isolierten RNA auf Degradation

Die RNA wurde in 1%igen Agarosegelen in TAE-Puffer, der jedoch mit DEPC-H₂O angesetzt wurde, aufgetrennt. Der Gellösung wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die RNA wurde mit Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die 18s- und 28s-Banden sichtbar gemacht und photographiert werden.

B.4.1.5 Nachweis von RNA (Northern Blot)

In der Northern Blot Analyse werden RNA-Moleküle durch Hybridisierung mit einer bekannten DNA-Sequenz als Sonde nachgewiesen. Dabei wird die aus Zellen aufgereinigte RNA in einem denaturierenden Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane) geblottet und fixiert. Nach Inkubation der Membran mit radioaktiv markierten Sonden können, nach Hybridisierung, die entstandenen DNA-RNA-Hybride lokalisiert und die Transkripte des der Sonde zugrundeliegenden Gens sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden.

Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem Agarose/Formaldehydgel.

1% Agarose/Formaldehydgel

3 g	Agarose
3,4 ml	3 M Natriumacetat, pH 4,8
1 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 200 ml	H ₂ O _{dd}
45 ml	Formaldehyd

Die Agarose wurde in H₂O_{dd}, EDTA und Natriumacetat durch Aufgekochen gelöst. Das Formaldehyd wurde nach dem Abkühlen zugegeben und das Gel wurde in eine mit 3% H₂O₂ ausgespülten Kammer gegossen.

10 bis 20 µg Gesamt-RNA wurden in 20 µl RNA-Auftragspuffer aufgenommen und für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden danach sofort auf Eis stabilisiert. Parallel zu den RNA-Proben wurde ein RNA Standard auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden bei 50 Volt für ca. 5 Stunden aufgetrennt.

Vor dem Blotten der aufgetrennten RNA-Moleküle auf die Nylon-Membran wurde das Gel zuerst zweimal fünf Minuten in DEPC-H₂O_{dd} gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen.

Für den Transfer der RNA wurde ein Schale mit 500 ml 10x SSC gefüllt, eine Glasplatte auf die Schale gelegt und ein Filterpapierstreifen so über die Glasplatte gelegt, daß er an beiden Seiten in die SSC-Lösung eintauchte. Das Gel wurde nun auf das Filterpapier gelegt, an den Rändern mit Parafilmstreifen abgedichtet und mit einer mit 10x SSC vorbehandelten Nylonmembran luftblasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurden zwei Whatman Papiere und ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Dieser Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht von 500 g beschwert. Der Transfer der RNA erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die RNA in einem UV-Transilluminator auf der Membran fixiert. Dann wurde die Membran mit Methylenblau 1 bis 2 Minuten gefärbt, der Membranhintergrund anschließend mit DEPC-H₂O_{dd} entfärbt. Der Marker und die Probenaschen, sowie die Banden der 18s und 28s RNA wurden auf der Membran markiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der spezifischen DNA-Sonde mußte die Membran prähybridisiert werden. Dazu wurde die Membran in einem Glasröhrchen unter Rotation mit Express Hyb-Hybridisierungslösung (5 ml pro 10 cm²) bei 68°C für 30 Minuten prähybridisiert.

Danach wurde eine Stunde mit frischer Hybridisierungslösung, der die mit ³²P radioaktiv markierte Sonde (B.4.3) zugegeben worden war, unter Rotation hybridisiert. Anschließend wurde 40 Minuten mit dem Waschpuffer 1 bei 37°C gewaschen, danach 40 Minuten mit dem Waschpuffer 2 bei 50°C. Beide Waschpuffer wurden mehrmals gewechselt.

Am Ende wurde die Membran in Folie eingeschweißt und auf eine PhosphoImagePlate gelegt und nach Exposition am PhosphoImager ausgewertet.

Um die Membran erneut hybridisieren zu können, mußte das gebundene ³²P entfernt werden. Dies erfolgte indem die Membran 10 Minuten unter Rühren in Stripping-Lösung aufgekocht wurde. Danach konnte die Membran wie oben beschrieben erneut hybridisiert werden.

Zuletzt erfolgte die Hybridisierung mit GAPDH um eine quantitative Auswertung zu erhalten.

B.4.1.6 cDNA-Synthese aus mRNA (Reverse Transkription)

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurde die RNA mit jeweils 1 µl 10 µM Oligo (dT)₁₂₋₁₈ und Random Primer für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und um das Anlagern der Primer zu ermöglichen. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt. Durch den Einsatz von Oligo (dT)₂₀-Primern wurde sichergestellt, daß für die cDNA-Synthese mRNA als Matrize diente. Die RNA wurde mit 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 2 µl 200 µM dNTP's, 0,5 µl RNasin und 1 µl Superscript II plus Reverse Transkriptase für 1 Stunde bei 37°C umgeschrieben.

Anschließend wurden die Enzyme für fünf Minuten bei 95°C inaktiviert.

B.4.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Saiki *et al.*, 1988) können definierte DNA-Abschnitte mittels spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, amplifiziert werden.

Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA erfolgt die Anlagerung (*annealing*) der Primer an die einzelsträngige DNA. Dieser kurze Doppelstrang wird durch eine spezielle DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) verlängert (*extension*), wobei aus einem Doppelstrang zwei neue Doppelstränge synthetisiert werden. Bei zyklischer Wiederholung dieser Reaktionsfolge kann der jeweilige DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt werden. Dieser Zyklus wurde in der Regel 30 mal wiederholt.

Im folgenden sind die PCR-Bedingungen für die verwendeten Primerpaare aufgeführt.

hCRLR, mCRLR

je 1 µl	Primer For/Rev (50 pmol)
2 µl	20 mM dNTP's
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
4,5 µl	10x Puffer
0,5 µl	DMSO
1-4 µl	cDNA
ad 45 µl	H ₂ O _{dd}
0,5 µl + 4,5 µl	Taq Polymerase + H ₂ O _{dd}
94°C	5 min
80°C	Zugabe der Taq Polymerase
94°C	1 min
63°C	1 min
72°C	1 min

m/hGAPDH, hRAMP-1

je 1 µl	Primer For/Rev (50 pmol)
2 µl	20 mM dNTP's
0,75 µl	50 mM MgCl ₂
5 µl	10x Puffer
1-4 µl	cDNA
0,5 µl	Taq Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}

94°C	1 min
63°C	1 min
72°C	1 min

mRAMP-1

je 1 µl	3-85 G/3-85 A (50 pmol)
2 µl	20 mM dNTP's
0,75 µl	10x Puffer + MgCl ₂ (25 mM)
1-4 µl	cDNA
0,5 µl	Taq Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O _{dd}

94°C	1 min
63°C	1 min
72°C	1 min

mCGRP-RCP

je 1 µl	mCGRP-RCP For/Rev (50 pmol)
2 µl	20 mM dNTP's
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
5 µl	10x Puffer
5 µl	DMSO
1-4 µl	cDNA
ad 45 µl	H ₂ O _{dd}
0,5 µl + 4,5 µl	Taq Polymerase + H ₂ O _{dd}

94°C	5 min
80°C	Zugabe der Taq Polymerase
94°C	1 min
50°C	1 min
72°C	1 min

hCGRP-RCP

je 1 µl	hCGRP-RCP For/Rev (50 pmol)
2 µl	20 mM dNTP's
1,5 µl	50 mM MgCl ₂
5 µl	10x Puffer
1-4 µl	cDNA
ad 45 µl	H ₂ O _{dd}

0,5 µl + 4,5 µl	Taq Polymerase + H ₂ O _{dd}
94°C	5 min
80°C	Zugabe der Taq Polymerase
94°C	1 min
58°C	1 min
72°C	1,5 min

Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion, München synthetisiert.

hCRLR For	AGT TCA TTC ATC TTT ACC TGA TGG
hCRLR Rev	GGA TGC TCT GTG GAA GGC AT
mCRLR For	CCA GGC CTT AGT AGC CAC AA
mCRLR Rev	GGA TGC TCT GTG GAA GGC AT
hGAPDH For	AAC TGC TTA GCA CCC CTG GCC
hGAPDH Rev	CAC CAC CCT GTT GCT GTA GCC
mGAPDH For	CAA TGC ATC CTG CAC CAC CAA
mGAPDH Rev	GTC ATT GAG AGC AAT GCC AGC
hRAMP-1 For	GCA CAC GAT TGG CTG TTT CTG G
hRAMP-1 Rev	ATG AAG TGT ACC AGA GAC CTG G
mRAMP-1 For	GAG ACG CTG TGG TGT GAC TG
mRAMP-1 Rev	GTA AGT CAA GGT CAC GTC CCT
hCGRP-RCP For	CAG CCA TTT CCT GGA CGT T
hCGRP-RCP Rev	TAT CTC TGT TGT TCT CGA GG
mCGRP-RCP For	ACA CAC ACG GAA CCG G
mCGRP-RCP Rev	GGG TCT GTG TGG CGC

Zur qualitativen Analyse der PCR-Produkte wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Alternativ wurden die PCR-Fragmente auf einer Membran immobilisiert und mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

Größe der PCR Amplifikate

hCRLR	541 bp
mCRLR	548 bp
h/mGAPDH	471 bp
hRAMP-1	528 bp
mRAMP-1	443 bp
hCGRP-RCP	454 bp
mCGRP-RCP	471 bp

Sollte das Reaktionsprodukt für eine Klonierung weiter verwendet werden, wurde anstelle der Taq Polymerase entweder das Expand High Fidelity PCR System oder die Pwo DNA Polymerase verwendet. Beide Polymerasen besitzen eine *proofreading* Aktivität. Es erfolgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes zur Entfernung überschüssiger Primer, Nebenprodukte und der Polymerase.

B.4.1.8 Semiquantitative PCR

Die Quantität der mRNA eines bestimmten Gens läßt sich im Verhältnis zu einem *Housekeeping*-Gen wie beispielsweise GAPDH darstellen. Dazu wurden serielle 1:3-Verdünnungen der cDNAs hergestellt und in der PCR eingesetzt. So wurde die höchste Verdünnungsstufe festgestellt, die noch ein Signal zeigte und das Verhältnis beider bestimmt.

Zur qualitativen Analyse der PCR-Produkte wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Alternativ wurden die PCR-Fragmente auf einer Membran immobilisiert und mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden hybridisiert.

B.4.1.9 Real-Time PCR mittels TaqMan

Im Unterschied zur traditionellen PCR, die den Endpunkt einer PCR-Reaktion detektiert, werden bei der Real-Time PCR die PCR-Produkte über Fluoreszenzsignale schon während der Reaktion detektiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Daten während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion gesammelt werden, in der sich die Anzahl der PCR-Produkte exakt verdoppelt und keine Limitierung der Reaktion durch verbrauchte Reaktionskomponenten besteht. Der Anstieg der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Anzahl der generierten Amplicons.

Bei der Real-Time PCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, der in die *minor groove* der doppelsträngigen DNA eingebaut wird. Die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Produktmenge. Da der Farbstoff in jede doppelsträngige DNA eingebaut wird, muß sichergestellt sein, daß die PCR-Reaktion für das untersuchte Gen spezifisch ist.

Die PCR wurde auf dem ABI Prism™ 7700 Sequence Detector durchgeführt und mit Hilfe des Programmes Sequence Detector v.1.6.3 ausgewertet.

Im Folgenden sind die PCR-Bedingungen für die verwendeten Primerpaare aufgeführt.

TNF- α

je 1 μ l	Primer For/Rev (20 pmol)
15 μ l	SYBR Green Master Mix
5 μ l	cDNA (0,1 μ g/ μ l)
ad 30 μ l	H ₂ O _{dd}

50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	0,15 min
66°C	1 min

 β -Aktin

je 1 μ l	Primer For/Rev (20 pmol)
15 μ l	SYBR Green Master Mix
5 μ l	cDNA (0,1 μ g/ μ l)
ad 30 μ l	H ₂ O _{dd}

50°C	2 min
95°C	10 min
95°C	0,15 min
66°C	1 min

Primer

mTNF- α For	AAA ATT CGA GTG ACA AGC CTG TAG C
mTNF- α Rev	GTG GGT GAG GAG CAC GTA G
β -Aktin For	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G
β -Aktin Rev	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC

B.4.1.10 Auftrennung von PCR-Produkten im Agarosegel

Bei der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäuren, durch das in einer Agarosematrix anliegende elektrische Feld, entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Die PCR-Produkte wurden in 1% Agarosegelen (in TAE-Puffer) aufgetrennt. Der Gellösung wurden 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA wurde mit dem entsprechenden Volumen 6x Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80-100 V. Als Größenstandard dienten DNA-Molekulargewichtsmarker entsprechend der zu erwartenden Banden. Die DNA konnte nach Einbau des Ethidiumbromids in die Doppelhelix unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden.

B.4.2 Nachweis von DNA (Southern Blot)

In der Southern Blot Analyse werden DNA-Moleküle unter Einsatz einer bekannten DNA als Sonde nachgewiesen. Dabei wird die aus Zellen aufgereinigte DNA oder ein PCR Produkt in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran (Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane) geblottet und fixiert. Nach Inkubation der Membran mit radioaktiv markierten Sonden können nach Hybridisierung die entstandenen DNA-DNA-Hybride lokalisiert und die Transkripte des der Sonde zugrundeliegenden Gens sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden.

25 µl eines PCR-Produkts wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Parallel dazu wurde ein geeigneter DNA Standard aufgetragen.

Bevor die aufgetrennten DNA-Moleküle auf eine Nylonmembran geblottet werden konnten, wurde die DNA im Agarosegel zuerst 10 Minuten in 0,25 N HCl denaturiert und danach 30 Minuten in 0,4 N NaOH neutralisiert.

Für den Transfer wurde ein Schale mit 500 ml 0,4 N NaOH/0,6 N NaCl gefüllt, eine Glasplatte auf die Schale gelegt und ein Filterpapierstreifen als Brücke über die Glasplatte gelegt, daß beide Seiten in die Blotlösung eintauchten. Das Gel wurde nun mit der Unterseite nach oben auf das Filterpapier gelegt, an den Rändern mit Parafilmstreifen abgedichtet und, mit einer in 0,4 N NaOH vorbehandelten Nylonmembran, luftblasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurden sechs Whatman Papiere und ein Stapel Papierhandtücher gelegt. Dieser Aufbau wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht von 500 g beschwert. Der Transfer der DNA erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die DNA in einem UV-Transilluminator auf der Membran fixiert. Der Marker und die Probenaschen wurden auf der Membran markiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der spezifischen DNA-Sonde mußte die Membran prähybridisiert werden. Dazu wurde die Membran in einem Glasröhrchen unter Rotation mit 20 ml Hybridisierungslösung bei 65°C 6 Stunden prähybridisiert. Der Hybridisierungslösung wurde zuvor aufgekochte und auf Eis abgekühlte *Salmon Sperm* DNA zugegeben, um unspezifische Bindung der DNA an die Membran zu verhindern.

Danach wurde etwa die Hälfte der Hybridisierungslösung verworfen und die mit ^{32}P radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Membran wurde über Nacht unter Rotation hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde der Blot zweimal für 30 Minuten mit Waschpuffer 1 und einmal für 30 Minuten Waschpuffer 2 bei 65°C gewaschen. Am Ende wurde die Membran in Folie eingeschweißt und auf eine PhosphoImagePlate gelegt und nach Exposition am PhosphoImager ausgewertet.

Um die Membran erneut hybridisieren zu können, mußte das gebundene ^{32}P entfernt werden. Dies erfolgte indem die Membran 10 Minuten unter Rühren in Stripping-Lösung aufgekocht wurde. Danach konnte die Membran wie oben beschrieben erneut hybridisiert werden.

B.4.3 Radioaktive Markierung von Sonden

Die Detektion von Genen oder anderen DNA-Abschnitten innerhalb eines DNA- oder RNA-Pools erfolgte mittels radioaktiv markierter Sonden (Southern Blot, Northern Blot).

Als Sonden wurden cDNA-Fragmente verwendet, die aus Vektoren ausgeschnitten wurden.

<i>Vektoren</i>	<i>Schnittstellen der Sonden</i>	<i>Größe der Sonden</i>
pBK-CMV-CATS	EcoR I, Xho I	1000 bp
pBK-CMV-mCRLR	EcoR I	1500 bp
pBK-CMV-mGAPDH	EcoR I, Xho I	1400 bp
pBK-CMV-Ramp-1	EcoR I, Xho I	450 bp
pGEM Teasy-hCGRP-RCP	EcoR I	500 bp

Tabelle B-14

25 ng der DNA wurden in 45 µl TE-Puffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und die Einzelstränge auf Eis stabilisiert. Der Reaktionsansatz wurde zu dem „Rediprime™II Random priming labelling system“-Ansatz pipettiert. Im Radioaktivraum wurden dann 5 µl α-dCTP zugegeben und es erfolgte dabei ein unspezifischer Einbau des radioaktiv markierten Nukleotids in die DNA-Sonde (20 Minuten, 37°C). Von nicht eingebauten Nukleotiden wurde die Sonde über eine Micro Spin Säule gereinigt. Die Sonde wurde dann erneut hitzedenaturiert und auf Eis stabilisiert bevor sie der Hybridisierungslösung zugegeben wurde.

B.4.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsanalyse von DNA diente entweder dem Nachweis bestimmter DNA-Fragmente oder dem Ausschneiden von DNA-Fragmenten zum Umklonieren.

Restriktionsverdaus von 1 bis 5 µg Plasmid-DNA und von DNA-Fragmenten fanden in einem Reaktionsvolumen von 20 bis 50 µl statt. Dabei wurden mindestens 2 U Enzym pro µg DNA unter den entsprechenden Pufferbedingungen eingesetzt, wobei der Verdau in der Regel für eine Stunde bei 37°C durchgeführt wurde. Beachtet wurde dabei, daß auf je 10 µl Reaktionsansatz nur 1 µl Enzym eingesetzt wurde, um die neutralisierende Wirkung des Glycerins im Enzymverdünnungspuffer zu inhibieren.

Anschließend wurden die verdauten DNA-Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt und das Bandenmuster mit dem anhand von Restriktionsenzymsschnittkarten ermittelten Schnittmuster verglichen.

B.4.5 Umklonierung von DNA-Fragmenten zwischen zwei Vektoren

B.4.5.1 Ausschneiden von DNA aus einem Vektor

Die gewünschte DNA (Insert) wurde mit Hilfe von zwei Restriktionsendonukleasen aus dem Vektor herausgeschnitten. Nach der Auftrennung im Agarosegel konnte die Insert-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert werden.

Parallel dazu wurde der zweite Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und ebenfalls über ein Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt.

B.4.5.2 DNA-Elution aus einem Agarosegel

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick-Gel-Extraktionskits.

Die gewünschte Bande wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in einem Eppendorfröhrchen mit dem dreifachen Volumen Puffer QG für 10 Minuten bei 50°C gelöst. Die DNA wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde auf eine QIAquick-Säule gegeben und, um die DNA an die Säule zu binden, für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl Puffer QG und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um Alkoholsuren zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 13.000 Upm für eine Minute zentrifugiert und dann in ein frisches Eppendorfröhrchen gegeben. Nun wurde mit 30 µl Puffer EB eluiert. Reinheit und Menge der DNA wurde anhand eines Aliquots in einem 1% igem Agarosegel überprüft.

B.4.5.3 Dephosphorylierung eines Vektors

Um eine unspezifische Religation des aufgeschnittenen Vektors zu verhindern, wurden die Termini dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA in einem 50 µl-Ansatz mit 3 u Alkalischer Phosphatase, sowie 5 µl 10x Puffer bei 37°C dephosphoryliert. Nach einer Stunde wurde das Enzym durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 bei 65°C inaktiviert. Zur Entfernung des Enzyms erfolgte eine Aufreinigung mittels des PCR Purification Kits.

B.4.5.4 Aufreinigung von PCR-Produkten und Enzymansätzen

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten oder enzymatisch verdauter DNA wurde der PCR Purification Kit verwendet.

Der Ansatz wurde mit dem fünffachen Volumen Puffer PB aufgefüllt und auf ein Säulchen gegeben. Um die DNA an die Säule zu binden wurde für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Um restliche Alkoholsuren zu entfernen, wurde die Säule noch einmal bei 13.000 Upm für eine Minute zentrifugiert und dann in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt. Nun wurde mit 30 µl Puffer EB eluiert. Reinheit und Menge der DNA wurde anhand eines Aliquots in einem 1% igem Agarosegel überprüft.

B.4.5.5 DNA-Ligation

Bei der DNA-Ligation wurden entweder geschnittene Inserts und Vektoren oder PCR-Produkte direkt mit einem dafür besonders geeigneten Vektor (PCR Blunt) ligiert.

Nach Aufreinigung der DNAs wurde das Insert in etwa dreifacher Menge mit dem Vektor, 1 µl T4-Ligase, 1 µl 10x Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht ligiert. Die Ligationstemperatur wurde entsprechend der Überhänge gewählt. Bei überhängenden Enden (sticky ends) wurde bei 4°C, bei blunt ends wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in Bakterien.

B.4.6 Transformation von Bakterien

Die Vermehrung von Plasmid-DNA erfolgte in geeigneten Stämmen von E.coli. Folgende Bakterienstämme wurden für die entsprechenden Plasmide verwendet:

TOP10F'	pCRBlunt
DH5α	alle übrigen Vektoren

Die Transformation erfolgte durch Hitzschock in die kompetenten Bakterien.

Hitzeschock ist eine Methode, bei der fremde DNA durch einen Temperaturschock in Bakterien eingeschleust werden kann.

B.4.6.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Bakterien wurden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Von einer Einzelkolonie wurde eine Übernachtskultur in 20 ml LB-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Mit 5 ml dieser Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,4 bei 600 nm kultiviert. Die Bakterien wurden bei 5.000 Upm für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde sofort auf Eis gestellt und mit 30 ml frischem und kaltem TSB Puffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

500 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

B.4.6.2 Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Für den Transformationsansatz wurde der Ligationsansatz mit 20 µl KCM und H₂O_{dd} auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden die Bakterien zugegeben und vorsichtig vermischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für exakt 30 Sekunden bei 42°C Hitze geschockt und sofort für zwei Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium, das auf 37°C vorgewärmt worden war, wurden die Bakterien eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten, mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die durch Aufnahme des Vektors die entsprechende Antibiotikaresistenz erworben hatten, bildeten Kolonien, die gepickt, expandiert und zur Plasmid-DNA-Isolierung genutzt werden konnten.

B.4.7 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte entsprechend der erforderlichen Menge über eine Minipräparation (Ausbeute etwa 30 µg Plasmid-DNA) oder eine Maxipräparation (Ausbeute etwa 800 µg Plasmid-DNA). Dafür wurde jeweils eine Einzelkolonie in der zur Präparation erforderlichen Menge LB-Medium mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im 37°C Schüttler inkubiert.

B.4.7.1 Minipräparation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke

Zur Minipräparation von Plasmid-DNA wurden eine Schnellmethode eingesetzt, bei der die Puffer des Qiagen Maxikits verwendet wurden.

2 ml Übernachtskultur wurden bei 6.000 Upm für zwei Minuten pelletiert und in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur, um die Zellen zu lysieren. Das Lysat wurde durch 300 µl Puffer 3 neutralisiert und der Zelldebris wurde 10 Minuten lang auf Eis gefällt. Es wurde 15 Minuten bei 10 000 Upm in einer Eppendorf Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und mit dem 0,8 fachen Volumen Isopropanol 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 11 000 Upm 15 Minuten lang pelletiert, einmal in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Da die Reinheit der mit dieser Methode gewonnenen DNA nicht sehr hoch ist, wurde sie für nur analytische Zwecke eingesetzt. Plasmid-DNA mit einem höheren Reinheitsgrad wurde durch Isolation mit dem Qiagen Maxikit erreicht.

B.4.7.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Für die Maxipräparationen der Plasmid-DNA wurden die Reagenzien von Qiagen verwendet. 500 ml einer Übernachtskultur wurden bei 4°C und 6.000 Upm für 8 Minuten pelletiert und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer 2 zur Lyse der Bakterien wurde der Ansatz geschüttelt und nicht länger als fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 10 ml Puffer 3 neutralisiert, geschüttelt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 16.000 Upm wurde der klare Überstand auf eine Qiagen-Säule 500 pipettiert, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA anschließend mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Durch Zugabe des 0,7 fachen Volumens Isopropanol wurde die DNA präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde bei 4°C und 11.000 Upm für 30 Minuten pelletiert, und mit 5 ml 70% igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 300 µl TE-Puffer oder H₂O_{dd} gelöst.

B.4.7.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm gegen TE-Puffer bzw. H₂O_{dd}. Bei einer Plasmid-DNA-Lösung entspricht eine optische Dichte von 1,0 einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung können durch Messen der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm bestimmt werden, indem man die Quotienten E₂₆₀/E₂₈₀ und E₂₆₀/E₂₃₀ bildet. Für hinreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäurelösungen gelten dabei folgende Richtwerte (Marmur, Sambrock):

$$E_{260}/E_{280} \geq 1,8$$

$$E_{260}/E_{230} \geq 2,2$$

B.5 Syngene Transplantation von Knochenmark

Bei der syngenischen Transplantation von Knochenmark wurden Knochenmarkszellen einer Spendermaus mit MIGR1 bzw. MIGR1/RAMP-1 Virusüberstand infiziert und in Empfängerermäuse transferiert.

B.5.1 Herstellung des Virusüberstandes

Die Phoenix-Zelllinie ist eine Retrovirus Producer Linie, mit der man ecotrope und amphotrope Retroviren produzieren kann. Sie wurde mit dem MIGR1-RAMP-1 bzw. mit dem MIGR1-Leervektor transient transfiziert.

18-24 Stunden vor der Transfektion wurden die Phoenix-Zellen mit einer Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ pro 6 cm Zellkulturschale ausgesät.

Am Tag der Transfektion wurde 5 Minuten vor der Transfektion 25 μ M Chloroquin zum Medium hinzugefügt, um lysosomale DNasen durch einen neutralisierten pH-Wert zu inhibieren. Die Transfektion selber erfolgte über die Ca_2PO_4 -Methode, nach folgendem Schema:

Plasmid-DNA	5-10 μ g
2M CaCl_2	61 μ l
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	ad 500 μ l

Der Ansatz wurde gut gemischt, und dann wurden 500 μ l 2xHBS unter vortexen zugegeben. Die HBS/DNA-Lösung wurden tropfenweise zu dem Medium gegeben.

24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen, bei 1500 Upm für 5 Minuten abzentrifugiert und anschließend durch einen 0,45 μ m Filter filtriert, um Zelldebris und ganze Zellen zu beseitigen. Der Virusüberstand kann bei -80°C gelagert werden.

B.5.2 Spininfektion des Knochenmarks

Spendermäusen wurde 5-Fluoruracil (150 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Nach 2 Tagen wurde das Knochenmark entnommen und mit 10 ng/ml IL-3, IL-6 und 50 ng/ml SCF vorstimuliert.

Nach 24 Stunden wurde das Knochenmark über eine Spininfektion 4 mal mit Virusüberstand infiziert. Dazu wurden die Zellen bei 32°C , 2200 Upm 90 Minuten zentrifugiert.

B.5.3 Transfer des infizierten Knochenmarks

Vor dem Transfer der infizierten Knochenmarkszellen wurden die Empfängerermäuse mit 800 rad bestrahlt, um das Knochenmark der Empfängerermäuse zu depletieren. Eine genormte Menge infizierter Knochenmarkszellen wurde den Empfängeräusen i.v. injiziert.

B.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des *Student's t*-Test für gepaarte Daten. Waren die Daten nicht normalverteilt, so erfolgte die Auswertung über den *Mann-Whitney Rank Sum Test*. Alle Daten sind als Mittelwerte $\pm$ SD aufgeführt. Unterschiede zwischen den Experimentalgruppen sind signifikant, wenn $<0,05$.

C: Ergebnisse

Das Nerven- und das Immunsystem interagieren miteinander. In dieser Arbeit wurden Effekte untersucht, die über das Neuropeptid CGRP und dessen Rezeptor, bestehend aus RAMP-1 und CRLR, vermittelt werden. Dabei werden von CGRP Impulse gesetzt, die im Microenvironment des Knochenmark von Bedeutung sind. So wurde der Einfluß von CGRP auf die Regulation der humanen Granulopoese und die Rolle von RAMP-1 in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark untersucht. Da CGRP an neuroimmunologischen Kommunikationen beteiligt ist, wurden über den Einfluss von CGRP auf aktivierte Antigenpräsentierende Zellen dessen immunmodulatorische Eigenschaften analysiert.

C.1 Regulation und Funktion des CGRP Rezeptor Komplexes in der humanen Granulopoese

Iversen *et al.* (2000) zeigten, dass Lymphozyten von Patienten, deren Knochenmark aufgrund einer Verletzung des Rückenmarks dezentralisiert war, in ihrer Funktion deutlich eingeschränkt waren. Außerdem war eine stark verminderte hämatopoetische Aktivität in den dezentralisierten Bereichen des Knochenmarks zu beobachten. Nach Meinung der Autoren sind diese zellulären Defekte möglicherweise in dem Verlust neuronaler Kontrolle von Immun- und Knochenmarksfunktionen begründet. Die Vermutung, dass die Regulation der Hämatopoese unter neuronaler Kontrolle steht, wurde auch in *in vivo* Experimenten an Mäusen bestätigt. Die Depletion von Neuropeptiden, wie Substanz P und CGRP, mit Capsaicin verhinderte eine normale Blutzellproduktion (Broome *et al.*, 2000).

Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, welche Funktion das Neuropeptid CGRP in der humanen Granulopoese hat.

C.1.1 Differentielle Expression des CGRP Rezeptor Komplexes

Zunächst wurde die mRNA Expression der CGRP Rezeptorkomponenten RAMP-1, CRLR und CGRP-RCP, sowohl in frisch isolierten CD34⁺-Progenitor Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut, als auch in Granulozyten des peripheren Blutes untersucht. In CD34⁺-Zellen konnten mittels RT-PCR mRNA Transkripte für RAMP-1, CRLR und CGRP-RCP bei allen Spendern detektiert werden. Hingegen wurden in Granulozyten keine Transkripte für RAMP-1 und CRLR detektiert. CGRP-RCP mRNA wurden in Granulozyten

von 8 der 15 Spender nachgewiesen. In Abbildung 7A sind die Ergebnisse von je 4 repräsentativen Spendern dargestellt.

Um auszuschließen, dass in Granulozyten RAMP-1 und CRLR mRNA-Transkripte in geringen Mengen synthetisiert werden, wurden die PCR Amplifikate auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Sonden hybridisiert (Abbildung 7B). Durch die Hybridisierung konnte eindeutig gezeigt werden, dass die CGRP-Rezeptorkomponenten RAMP-1 und CRLR in humanen CD34⁺-Progenitorzellen und in Granulozyten differentiell exprimiert werden.

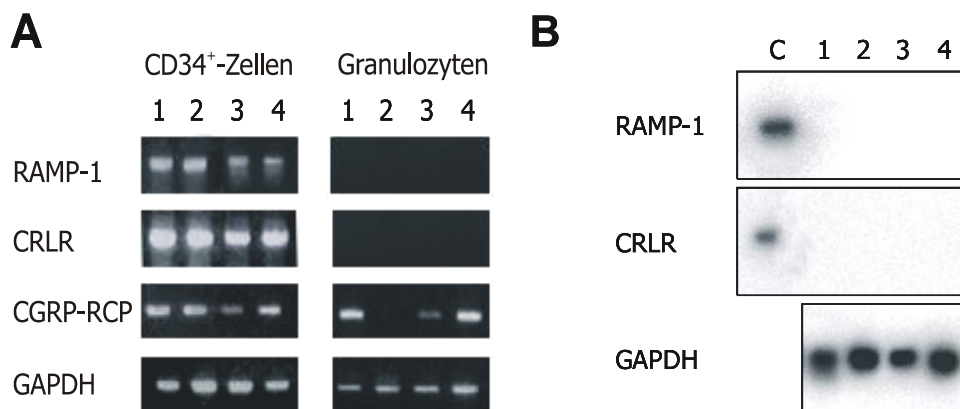


Abbildung 7: Differentielle Expression der CGRP Rezeptorkomponenten in CD34⁺-Zellen und Granulozyten.

(A) RNA wurde von aufgereinigten CD34⁺-Zellen bzw. Granulozyten isoliert und für die RT-PCR eingesetzt. Die Zahlen geben die entsprechenden Donoren an.

(B) RT-PCR Produkte von vier Spendern wurden auf Nitrocellulose Membran geblottet und mit Sonden, spezifisch für RAMP-1, CRLR und GAPDH, hybridisiert. Als Positivkontrolle wurde das PCR-Produkt von HEK293 Zellen verwendet (Spur C).

Um zu zeigen, dass die CGRP-Rezeptorexpression mit einem funktionellen CGRP-Rezeptor korreliert, wurde das CGRP-Signalling über die Messung von cAMP nach Stimulation mit 100 nM CGRP gemessen. Aus Abbildung 8A ist ersichtlich, dass die CD34⁺-Progenitorzellen nach CGRP Stimulation schnell und deutlich mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels reagieren. Um zu überprüfen, ob die cAMP Produktion spezifisch durch CGRP induziert wurde, wurden Experimente mit dem CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ durchgeführt. Zur kompetitiven Inhibition des CGRP-Rezeptors wurden CD34⁺-Progenitorzellen mit 1 µM CGRP₈₋₃₇ inkubiert und anschließend mit 10 nM CGRP anstelle von 100 nM CGRP stimuliert. Dadurch sollten überschüssige Mengen an CGRP vermieden werden. Wegen seiner geringen Affinität zum CGRP Rezeptor muß der CGRP-Rezeptorantagonist mindestens im 100fachen Überschuß vorliegen (Chiba *et al.*, 1989). Der zelluläre cAMP-Spiegel wurde nach 5 Minuten gemessen, da in den meisten Experimenten die maximalen cAMP Levels nach 2 bis 10 Minuten detektiert wurden. Der

CGRP-Rezeptor-Antagonist blockierte den durch CGRP induzierten Anstieg zellulären cAMPs in CD34⁺-Zellen (Abbildung 9).

Im Gegensatz zu den CD34⁺-Progenitorzellen führte CGRP in Granulozyten nicht zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels. Die Irresponsivität der Granulozyten war jedoch unabhängig von der Expression der Rezeptorkomponente CGRP-RCP. In Kontrollexperimenten wurde gezeigt, dass die isolierten Granulozyten G-Protein-abhängig in der Lage waren cAMP zu produzieren (Abbildung 8B), nachdem sie mit PGE₂ stimuliert wurden.

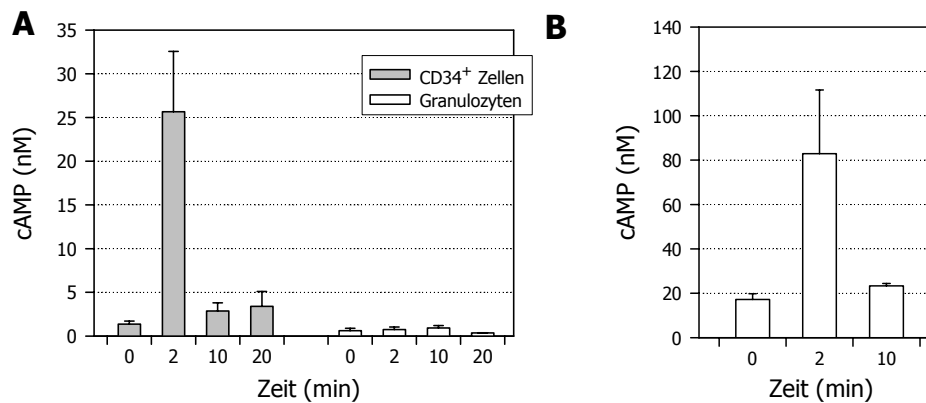


Abbildung 8: CGRP induziert erhöhte cAMP Levels in CD34⁺-Zellen, nicht aber in Granulozyten.

(A) Aufgereinigte CD34⁺-Zellen und Granulozyten aus dem peripheren Blut wurden mit 100 nM CGRP für die angegebenen Zeiträume stimuliert und die zellulären cAMP-Spiegel bestimmt. Der Graph repräsentiert drei bzw. vier unabhängige Experimente.

(B) Granulozyten des peripheren Blutes wurden mit 1 µM PGE₂ für die angegebenen Zeiträume stimuliert und die zellulären cAMP Levels gemessen. Der Graph zeigt den Mittelwert von drei Spendern.

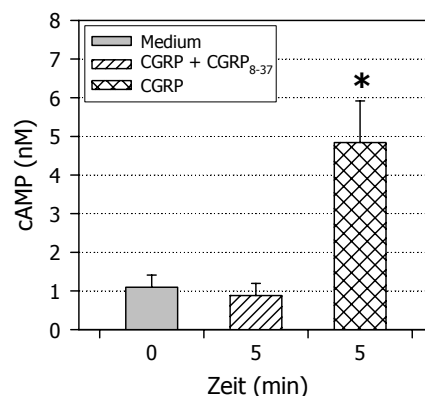


Abbildung 9: CGRP induziert spezifisch cAMP in CD34⁺-Zellen.

CD34⁺-Progenitorzellen wurden mit 1 µM CGRP₈₋₃₇ inkubiert und anschließend mit 10 nM CGRP anstelle von 100 nM CGRP stimuliert. Der Graph zeigt 4 unabhängige Experimente. (* p < 0,05, wobei CGRP versus unstimuliert bzw. CGRP + CGRP₈₋₃₇).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein funktioneller CGRP-Rezeptor im Gegensatz zu Granulozyten, in frisch isolierten CD34⁺-Progenitorzellen exprimiert wird.

C.1.2 Herunterregulierung des CGRP-Rezeptors während der Granulopoese *in vitro*

Die differentielle Expression des CGRP-Rezeptors in CD34⁺-Progenitorzellen und in Granulozyten deutet auf eine Regulation des Rezeptors während der Granulopoese hin. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wurden CD34⁺-Progenitorzellen *in vitro* durch Inkubation mit SCF und G-CSF maturiert. RNA wurde nach 2, 5, 13 und 20 Tagen isoliert. RAMP-1- und CRLR-Leveln wurden mittels semiquantitativer PCR bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mRNA-Transkripte für beide Gene im Laufe der *in vitro* Granulopoese herunterreguliert wurden (Abbildung 10, Tabelle C-1). So wurden an Tag 2 und 5 der Kultur zwar noch beide Rezeptoruntereinheiten exprimiert, doch zu den späteren Zeitpunkten konnten keine mRNA-Transkripte mehr detektiert werden.

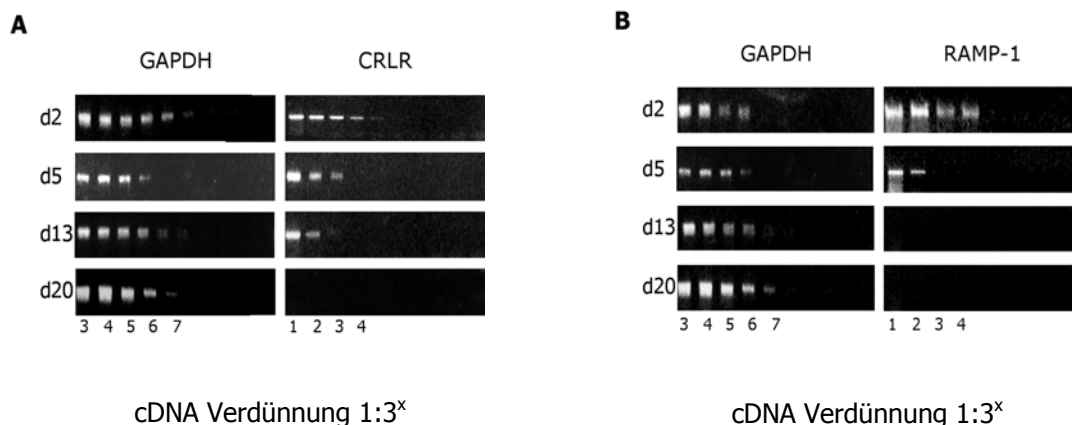


Abbildung 10: Herunterregulierung von RAMP-1 und CRLR während der *in vitro* Granulopoese.

CD34⁺-Zellen wurden mit SCF und G-CSF maturiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mRNA isoliert. Serielle 1:3 Verdünnungen wurden als Template für die RT-PCR verwendet, um RAMP-1, CRLR oder GAPDH Transkripte zu detektieren. Die Abbildung zeigt eines von drei repräsentativen Experimenten.

Rezeptor Komponente	in vitro Differenzierung	mRNA Ratio (normalisiert gegen GAPDH)		
		Donor #1	Donor #2	Donor #3
hRAMP-1	d 2	0,02	0,11	0,0001
	d 5	0,03	0,04	0,0001
	d 13	0	0	0
	d 20	0	0	0
hCRLR	d 2	0,01	0,04	0,0001
	d 5	0,004	0,04	0,0001
	d 13	0	0,004	0
	d 20	0	0	0

Tabelle C-1

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Funktionalität des CGRP-Rezeptors der *in vitro* differenzierten CD34⁺-Progenitorzellen, anhand von cAMP Messungen nach Stimulation mit 100 nM CGRP, untersucht. Aus Abbildung 11 ist ersichtlich, dass CD34⁺-Progenitorzellen, welche zwei Tage mit SCF und G-CSF maturiert wurden, mit einem deutlichen Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels reagierten. Im Gegensatz dazu, zeigten CD34⁺-Progenitorzellen, die 14 Tage mit SCF und G-CSF differenziert wurden, keine CGRP Responsivität.

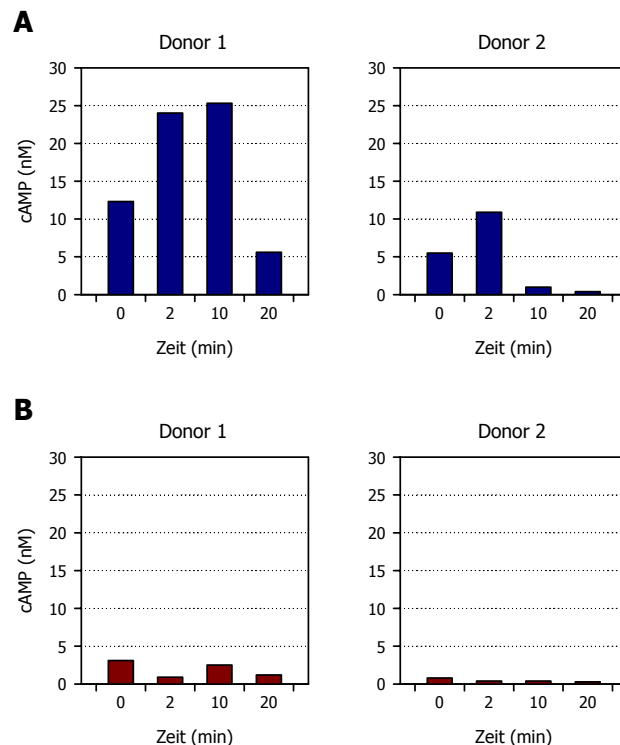


Abbildung 11: Verlust der CGRP Responsivität während der *in vitro* Granulopoese.

(A) Aufgereinigte CD34⁺-Zellen wurden 2 Tage (A) bzw. 14 Tage (B) mit SCF und G-CSF maturiert, dann mit 100 nM CGRP für die angegebenen Zeiträume stimuliert, anschließend wurden die zellulären cAMP-Spiegel bestimmt. Der Graph zeigt eines von drei repräsentativen Experimenten.

Diese Ergebnisse weisen auf einen strukturellen und funktionellen Verlust des CGRP-Rezeptors während der humanen Granulopoese hin.

C.1.3 Der Einfluß von CGRP auf die *in vitro* Myelopoese

Aus dem Maussystem ist bekannt, dass CGRP zusammen mit IL-3 hämatopoetische Progenitorzellen zur Myelopoese stimuliert (Broome *et al.*, 2000). Davon ausgehend wurden CD34⁺-Progenitorzellen mit SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6, EPO und mit bzw. ohne CGRP inkubiert. Die Bildung von granulomonozytischen, erythroiden und gemischten Kolonien wurde quantifiziert. Die absoluten Anzahlen der Kolonien in Ansätzen ohne Neuropeptid waren $33,4 \pm 5,4$ (CFU-GM), $24,8 \pm 5,2$ (BFU-E) und $4,7 \pm 1,7$ (CFU-Mix). Durch die Zugabe von CGRP erhöhte sich die Anzahl der CFU-GM um das 1.2fache. Der durch CGRP induzierte Anstieg an CFU-GM war signifikant und konnte durch die Zugabe des CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇ komplett blockiert werden. Übereinstimmend mit den unter C.1.1 und C.1.2 gezeigten Funktionen von CGRP in der Granulopoese, hatte CGRP nur einen Einfluß auf die Bildung der CFU-GM und jedoch nicht auf die BFU-E oder CFU-Mix (Abbildung 12). Aus diesen Experimenten ist ersichtlich, daß CGRP die Granulopoese humaner CD34⁺-Progenitorzellen fördert.

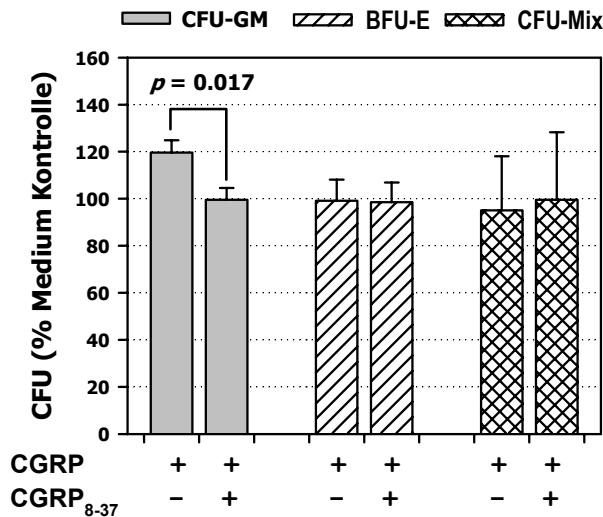


Abbildung 12: CGRP fördert die Granulopoese humaner CD34⁺-Progenitorzellen.

Aufgereinigte CD34⁺-Zellen wurden mit SCF, GM-CSF, IL-3, IL-6, and EPO inkubiert. Die Bildung der CFU-GM, BFU-E, und CFU-Mix wurde nach 14 Tagen bestimmt. CGRP (1 nM) oder CGRP₈₋₃₇ (100 nM) wurden so wie angegeben zu den Kulturen gegeben. Die Resultate werden als Prozent der Kolonien ohne Zugabe von CGRP oder CGRP₈₋₃₇ angegeben (Medium Kontrolle). Absolute Zahlen der Kolonien der Medium Kontrolle waren 33.4 ± 5.4 (CFU-GM), 24.8 ± 5.2 (BFU-E), und 4.7 ± 1.7 (CFU-Mix). Die Resultate wurden in 8 unabhängigen Experimenten gewonnen.

C.2 Die Bedeutung der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 in der murinen Hämatopoese

Im vorangegangenen Kapitel wurde eindeutig die Relevanz des CGRP-Rezeptors in der humanen Granulopoese in einem *in vitro* System gezeigt. Um die wichtige modulative Funktion des CGRP-Rezeptors in einem *in vivo* System zu bestätigen wurde ein murines Model gewählt, in dem die CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 überexprimiert wurde. Dazu wurde RAMP-1 zunächst in einen retroviralen Vektor kloniert, mit welchem Knochenmarkszellen transduziert wurden, die anschließend in Balb/c-Mäuse transferiert wurden.

C.2.1 Retrovirale Transduktion von mRAMP-1 in NIH 3T3/CRLR Zellen

Das murine RAMP-1 Gen wurde aus dem pLEN-mRAMP-1-Vektor über BamHI/XhoI ausgeschnitten und über BglII/XhoI in den MIGR1-Vektor kloniert. Der MIGR1-Vektor weist zwei „Long terminal repeats“ (LTR) auf, sowie eine „internal ribosomal entry site“ (IRES) (Abbildung 13). Diese viralen Komponenten ermöglichen, dass sowohl das *ramp-1*- als auch das *egfp*-Gen gleichzeitig exprimiert werden.



Abbildung 13: Aufbau des MIGR1/mRAMP-1-Vektors.

Der Vektor umfaßt die retroviralen Elemente 5'LTR, 3'LTR und IRES, sowie die Gene für mRAMP-1 und EGFP.

Durch transiente Transfektion in NIH 3T3-Zellen wurde die Funktionalität von mRAMP-1 im MIGR1-Vektor getestet. NIH 3T3-Zellen, die CRLR stabil exprimieren, erhöhten nur in geringem Maße den zellulären cAMP Spiegel nach Stimulation mit 100 nM CGRP. NIH 3T3-Zellen, die zusätzlich durch Lipofektion mit MIGR1/mRAMP-1 transient transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Abbildung 14).

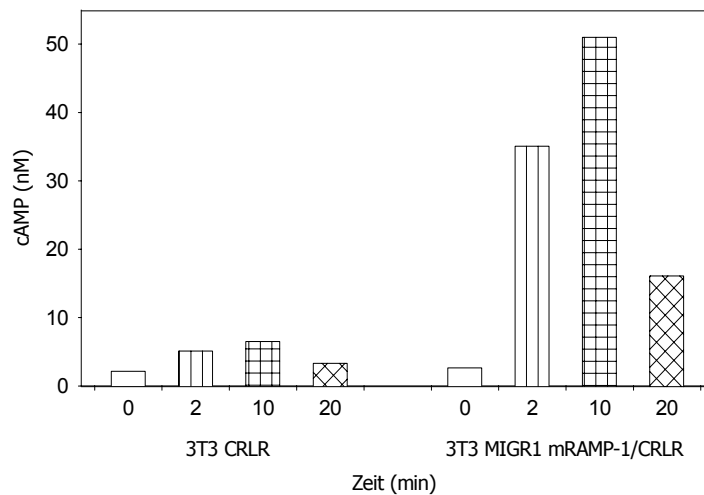


Abbildung 14: CGRP induziert erhöhte cAMP Levels in RAMP-1 cotransfizierten NIH 3T3/CRLR-Zellen.

NIH 3T3/CRLR-Zellen und RAMP-1 cotransfizierte NIH 3T3/CRLR-Zellen, wurden mit 100 nM CGRP für die angegebenen Zeiträume stimuliert, und die zellulären cAMP-Spiegel wurden bestimmt.

C.2.2 Überexpression von mRAMP-1 in Knochenmarkszellen durch retroviralen Gentransfer

Überexpression von mRAMP-1 in Knochenmarkszellen wurde durch retroviralen Gentransfer erreicht. Dazu wurde die Retrovirus *Producer* Zelllinie Phoenix mit dem MIGR1/mRAMP-1- bzw. MIGR1-Vektor transfiziert. Knochenmarkszellen aus Balb/c-Mäusen wurden mit dem von den Phoenix-Zellen produzierten Virusüberstand transduziert. Diese infizierten Knochenmarkszellen wurden durch i.v. Injektion in Balb/c-Mäuse transferiert, die zuvor mit 800 rad bestrahlt wurden, um eigene Knochenmarkszellen zu depletieren. Als Kontrollgruppe dienten Balb/c-Mäuse, die mit dem MIGR1-Vektor infizierte Knochenmarkszellen erhalten hatten.

3 bis 5 Monate nach Transfer des infizierten Knochenmarks wurden sowohl Milz als auch Knochenmark der Mäuse analysiert.

Um zu überprüfen, ob der transduzierte CGRP-Rezeptor funktionell aktiv ist, wurden Milzzellen isoliert. Mittels Mo-Flo wurden hoch EGFP⁺-Zellen sortiert. Die so erhaltenen Milzzellen wurden mit 100 nM CGRP für 0, 2 und 10 Minuten stimuliert. Die Milzzellen von Mäusen mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark zeigten einen deutlichen Anstieg des intrazellulären cAMP im Vergleich zu den Milzzellen der Kontrollmäuse (Abbildung 15).

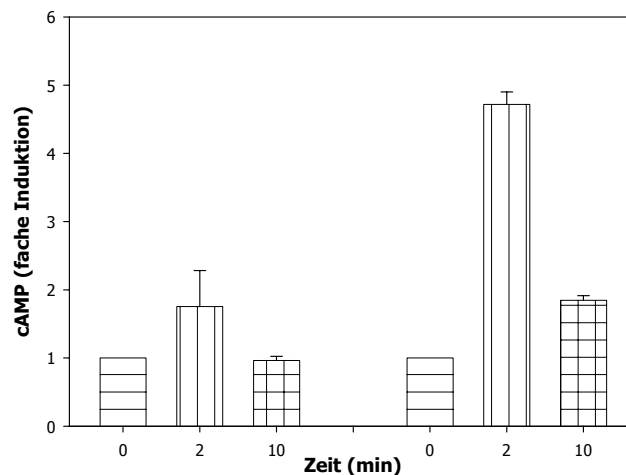


Abbildung 15: CGRP induziert im Vergleich zum Kontrollvektor erhöhte cAMP-Levels in EGFP⁺ Milzzellen von Balb/c Mäusen, die mit MIGR1/RAMP-1 transduziertem Knochenmark rekonstituiert waren. EGFP⁺-Milzzellen von MIGR1 bzw. MIGR1/RAMP-1-Mäusen wurden mit 100 nM CGRP stimuliert und die zellulären cAMP-Spiegel mittels ELISA bestimmt. Die Abbildung fasst die Ergebnisse von drei Experimentaltieren zusammen.

C.2.3 Hämatopoetische Aktivität von RAMP-1 transduzierten Knochenmarkszellen

Der Beitrag der EGFP⁺-, d.h. der RAMP-1⁺-Zellen zur Rekonstitution und Entwicklung hämatopoetischer Lineages wurde durch Analyse der Expression der Marker CD11b, B220 sowie Thy 1.2 untersucht. Dazu wurden Zellen des peripheren Blutes, der Milz und des Knochenmarks analysiert.

Die Rekonstitution der Mäuse mit myeloiden-, B- und T-Zell-Lineages zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mäuse mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark und der Kontrollgruppe. Im peripheren Blut der Mäuse mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark war jedoch eine erhöhte, nicht signifikante, Rekonstitution der myeloiden Lineage zu beobachten.

Die Experimente mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark zeigten eine weitaus geringere hämatopoetische Rekonstitution. Diese Beobachtung konnte durch den Anteil der EGFP⁺-Zellen, die den Mäusen injiziert wurden, erklärt werden. Der Anteil der EGFP⁺-Zellen der Kontrollgruppe lag bei 34% im Vergleich zu 11% in der RAMP-1-Gruppe. Dies spiegelte sich in den Zellzahlen der RAMP-1-Gruppe wieder, die bei etwa 1/3 der Kontrollgruppe lagen (Abbildung 16). Der Unterschied in der Transduktion von Knochenmarkszellen war durch einen geringeren Titer der MIGR1/RAMP-1 Viren erklärbar.

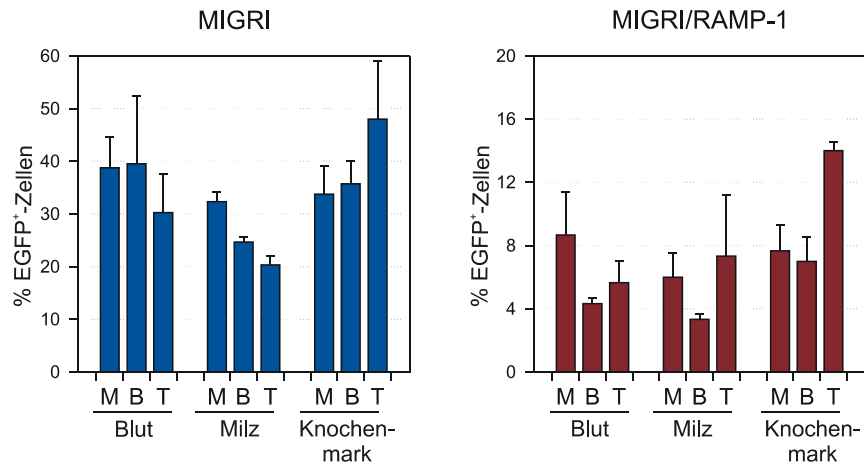


Abbildung 16: Rekonstitution der myeloiden-, B- und T-Zell-Lineages mit RAMP-1 zeigt keine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Der Anteil der EGFP⁺-Zellen in myeloiden (M), B- (B) und T-Zell (T) Populationen in peripherem Blut, Knochenmark und Milz wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Abbildung repräsentiert drei unabhängige Analysen.

C.2.4 Lokalisation von RAMP-1 transduzierten Knochenmarkszellen in Knochenmark und Milz

Da die Experimente mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark geringere Zellzahlen aufwiesen als die Kontrollgruppe, wurde in einem Kurzzeit-Experiment untersucht, ob die Überexpression von RAMP-1 das Homing der Knochenmarkszellen verändert. Dazu wurde der Anteil der EGFP⁺-Zellen in Knochenmark und Milz 12 Stunden nach Transfer des transduzierten Knochenmarks mittels FACS-Analyse bestimmt. Wie in Tabelle C-2 ersichtlich, war der Anteil der EGFP⁺-Zellen in den RAMP-1-Mäusen geringer als in den Kontrollmäusen. Die Tabelle zeigt das Ergebnis einer Analyse mit Experimentaltieren. Die Überexpression der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 hatte keinen Einfluß auf die hämatopoetische Aktivität der transduzierten Knochenmarkszellen. Das Homing der mit RAMP-1 transduzierten Knochenmarkszellen war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert.

	<i>EGFP⁺-Zellen pro 1x10⁶ Zellen</i>	
	Knochenmark	Milz
MIGR1	200±40	485±165
MIGR1/RAMP-1	94±9	325±45

Tabelle C-2

C.3 Die Rolle von RAMP-1 in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark

Eine der Hauptursachen für die Mortalität vieler Tumorpatienten liegt nicht in der Ausbildung eines Primärtumors, sondern in dem Auftreten von Rezidiven, die häufig viele Jahre nach erfolgreicher Behandlung des Primärtumors auftreten. Diese Beobachtung und der Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark unterstützen die Vermutung, dass Tumorzellen im Organismus latent überdauern können. Dieses Phänomen der *tumor dormancy* ist ein Zustand, in dem Tumorzellen in einem klinisch unauffälligen Patienten persistieren. Die Population der Tumorzellen verändert sich dabei wenig oder gar nicht (Müller *et al.*, 1998). Für die Persistenz der Tumorzellen im Knochenmark könnten Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stroma im Knochenmark eine Rolle spielen. Von Riedl (2000) wurde gezeigt, dass T- und B-Zell-Lymphomzelllinien RAMP-1 und CRLR exprimieren. Anhand eines Mausmodells wurde die Rolle von RAMP-1 in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark überprüft.

Die Lymphom-Zelllinien LCI, LCI sort., KM1 und KM2 wurden im Labor von V. Schirmacher generiert (Müller *et al.*, 1998) (Tabelle C.3). Eine subcutane Injektion der Lymphomzelllinie LCI (= EblacZ), in DBA/2-Mäuse, führte zur Bildung von letalen Primärtumoren. Wurden allerdings 2×10^6 Zellen in ein Ohr einer DBA/2-Mäuse injiziert, so wurden keine Tumoren oder Metastasen detektiert. Im Knochenmark der Mäuse jedoch wurden disseminierte Zellen gefunden, die im Zustand einer *tumor dormancy* vorlagen. Aus diesen disseminierten Zellen wurden die Zelllinien KM1 und KM2 generiert.

An den LCI injizierten DBA/2-Mäusen wurde gezeigt, dass die Persistenz der Tumorzellen von CD8⁺-T-Zellen kontrolliert wird, denn die Depletion dieser Zellen mit monoklonalen Antikörpern, führte zur Bildung von Tumoren und somit zu einer Termination der *tumor dormancy* (Müller *et al.*, 1998) (Abbildung 17).

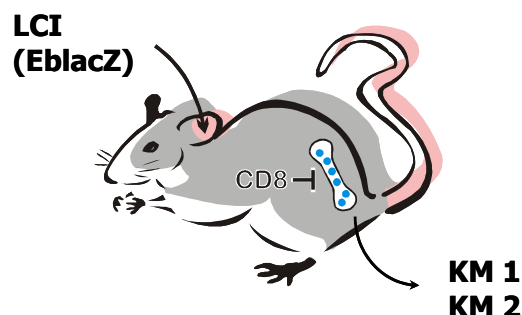


Abbildung 17: Mausmodell, in dem die Zelllinien LCI, LCI sort., KM1 und KM2 generiert wurden.

<i>Zelllinie</i>	<i>Eigenschaften</i>
LCI (= EblacZ)	ursprüngliche Lymphomzelllinie, die das lacZ-Gen exprimiert
LCI sort.	LCI-Zellen, die auf erhöhte LacZ-Aktivität gesortet wurden
KM1, KM2	im Knochenmark persistierende Zellen

Tabelle C-3

C.3.1 Differentielle Regulation des CGRP-Rezeptors

Zunächst wurde die mRNA Expression der CGRP Rezeptorkomponenten RAMP-1, CRLR und CGRP-RCP, in den Zelllinien LCI, LCI sort., KM1 und KM2 mittels RT-PCR analysiert. In allen Zelllinien konnten mRNA Transkripte für RAMP-1 und CGRP-RCP detektiert werden (Abbildung 18A). Hingegen wurden Transkripte für CRLR nur in den Lymphomzelllinien LCI und LCI sort. nachgewiesen. Dieses Ergebnis wurde in einer Northern Blot Analyse bestätigt (Abbildung 18B).

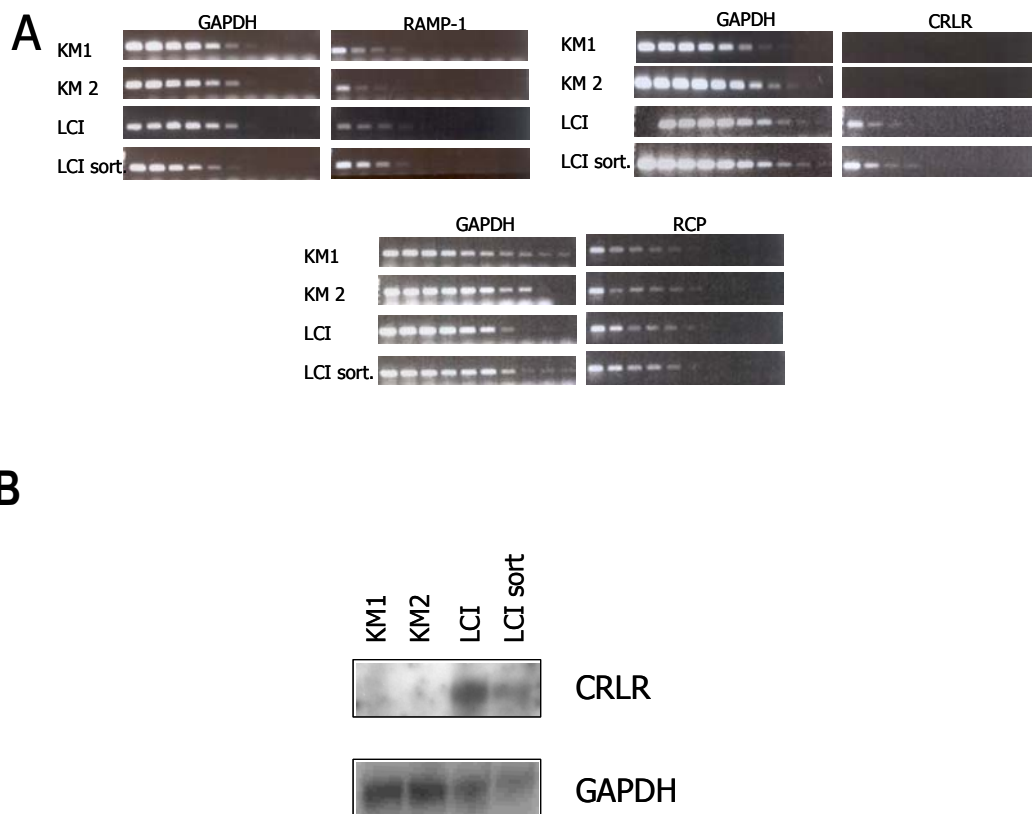


Abbildung 18: LCI und LCI sort. exprimieren im Gegensatz zu KM1 und KM2 die Rezeptorkomponente CRLR.

(A) Von LCI-, LCI sort., KM1- und KM2-Zellen wurde RNA isoliert und in der RT-PCR verwendet.

(B) 10 µg mRNA wurde auf eine Nitrocellulose Membran geblottet und mit Sonden, spezifisch für CRLR und GAPDH, hybridisiert.

Um zu zeigen, dass die CGRP-Rezeptorexpression mit einem funktionellen CGRP-Rezeptor korreliert, wurde das CGRP-Signalling über die Messung von cAMP nach Stimulation mit 100 nM CGRP gemessen. Abbildung 19 zeigt, dass die Zelllinien LCI und LCI sort. nach CGRP Stimulation schnell und deutlich mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels reagieren. Die Zelllinien KM1 und KM2 dagegen erhöhen die zellulären cAMP-Spiegel nach Stimulation nicht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Korrelation zwischen dem Verlust der CGRP-Rezeptorkomponente CRLR, der Irresponsivität auf CGRP und der Persistenz der KM-Lymphomzellen im Knochenmark besteht.

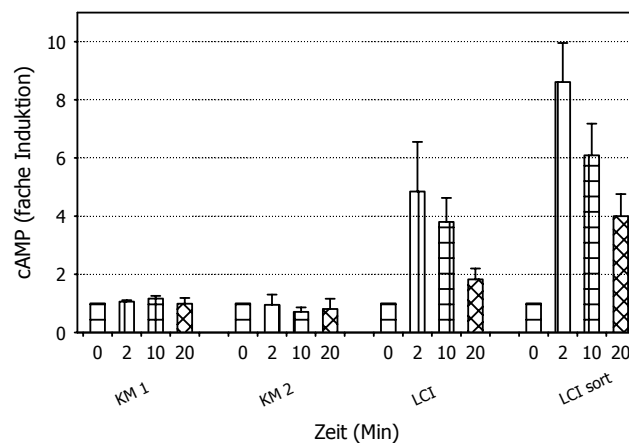


Abbildung 19: CGRP induziert erhöhte cAMP Levels in den Zelllinien LCI und LCI sort., nicht aber in den Zelllinien KM1 und KM2.

Die Zelllinien LCI, LCI sort., KM1 und KM2 wurden mit 100 nM CGRP für die angegebenen Zeiträume stimuliert und die zellulären cAMP-Spiegel wurden bestimmt. Der Graph repräsentiert drei bzw. vier unabhängige Experimente.

C.3.2 Differentielle Expression von Adhäsionsmolekülen

Die ursprünglichen LCI-Varianten unterscheiden sich von den KM-Zellen durch ihre Persistenz im Knochenmark.

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die Persistenz der KM-Zellen im Knochenmark über eine Regulation von Adhäsionsmolekülen beeinflusst werden konnte. Beide LCI-Varianten wurden auf die Expression von Integrinen mittels FACS-Analyse untersucht.

Im Vergleich zu den LCI-Zellen wurde die Expression der Integrine $\alpha 4$ und $\beta 1$, ICAM-2 und LFA-1 in den KM-Varianten nur wenig reguliert. Im Gegensatz dazu, wurde das Integrin $\beta 7$ in KM-Varianten deutlich hochreguliert und die Expression von L-Selektin deutlich herunterreguliert (Abbildung 20).

Aus diesen Experimenten ist ersichtlich, dass sich die beiden LCI-Varianten deutlich in der Regulation des Integrins $\beta 7$ und von L-Selektin unterscheiden, was für die Eigenschaften der beiden Lymphomzelllinien bzgl. ihrer Persistenz im Knochenmark eine Rolle spielen könnte.

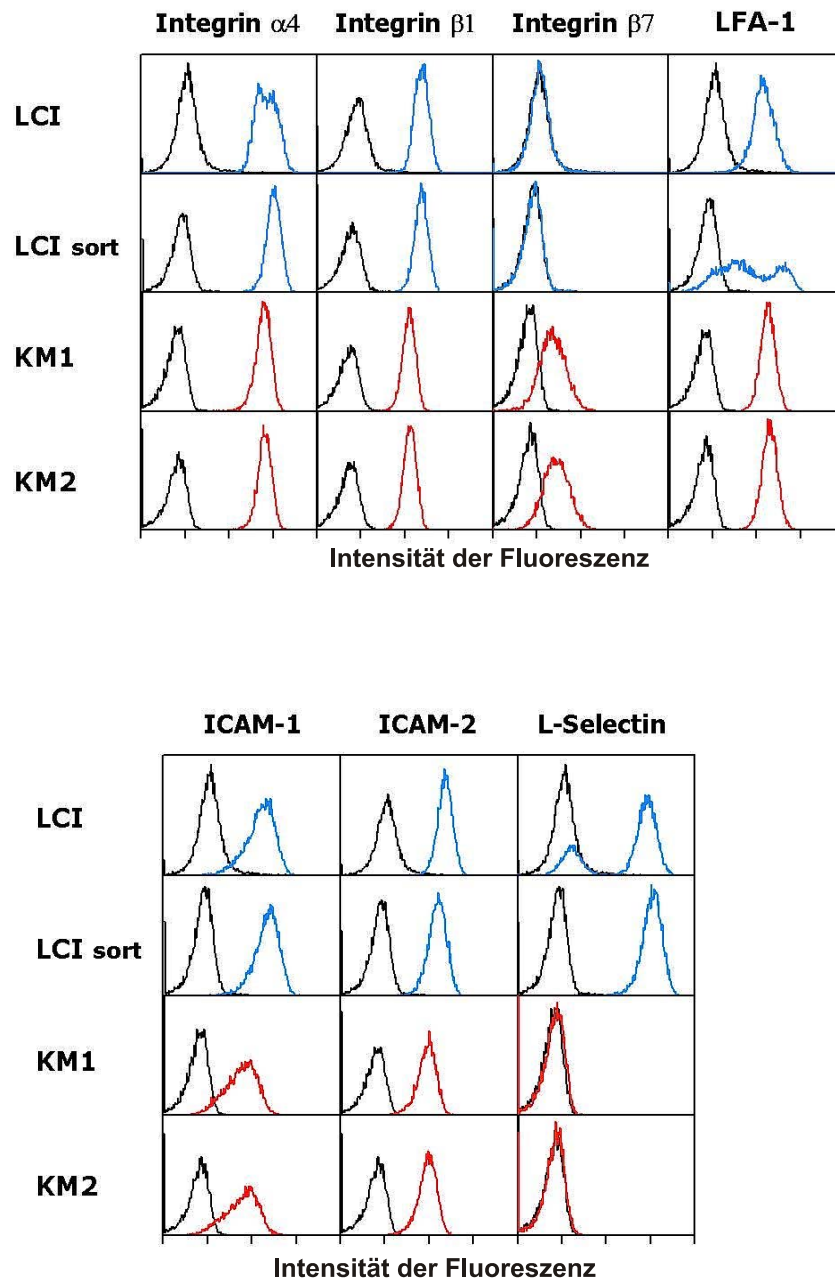


Abbildung 20: Expressionsanalyse von Adhäsionsmolekülen in den Zelllinien LCI, LCI sort., KM1 und KM2.

Die Expression der Integrine $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 7$ sowie LFA-1, ICAM-1, ICAM-2 und L-Selectin wurde analysiert. Die schwarze Linie stellt die Isotypkontrolle dar, die farbige Linie den entsprechenden Antikörper. Die Abbildung spiegelt eine von drei repräsentativen FACS-Analysen wieder.

C.4 Die Bedeutung von CGRP bei der Aktivierung von Antigenpräsentierenden Zellen

Hosoi *et al.*, (1993) zeigten durch konfokale Laserscanning Mikroskopie, den Kontakt von CGRP⁺-Nervenfasern mit CD1⁺ Langerhans' Zellen der Epidermis. In weiterführenden Experimenten wurde die Bedeutung von CGRP in der Regulation von Antigenpräsentierenden Zellen beschrieben. So wurde beispielsweise gezeigt, dass CGRP in Langerhans' Zellen die DTH-Antwort vermindert.

Aus diesem Grund wurde in vorliegender Arbeit die Aktivierung primärer Dendritischer Zellen in Abhängigkeit vom Neuropeptid CGRP untersucht.

C.4.1 Generierung von Dendritischen Zellen

Die Generierung von Dendritischen Zellen erfolgte aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäusen, mittels FLT3L bzw. GM-CSF.

FLT3L differenziert Knochenmarkszellen in die drei bisher bekannten DC-Subsets, die myeloiden (mDC), plasmazytoiden (pDC) und lymphoiden Dendritischen Zellen (IDC), die alle CD11c exprimieren, sich aber durch Expression weiterer Oberflächenmoleküle unterscheiden (Tabelle C-4).

	<i>CD11c</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD45RA</i>
pDC	+	-	+
mDC	+	+	-
IDC	+	-	-

Tabelle C-4

Im Verlauf der Kultur verändert sich der Anteil der einzelnen Subpopulationen. So konnten am Tag 10 durch Sorten der Kultur auf CD11c⁺CD45RA⁺- und CD11c⁺CD45RA⁻-Zellen plasmazytoide (ca. 30% der Ausgangspopulation) und myeloide Dendritische Zellen gewonnen werden (Abbildung 21).

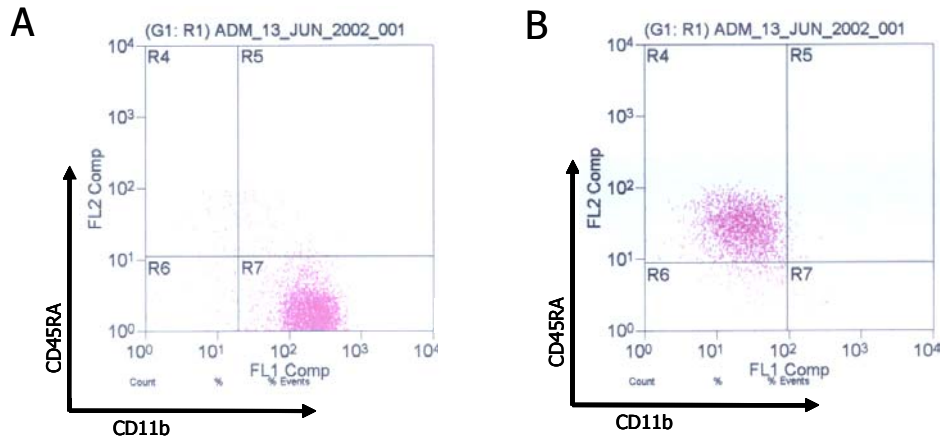


Abbildung 21: Beispiel einer Kontrollfärbung mit CD11b und CD45RA von gesorteten (A) CD11b⁺CD45RA⁻ myeloiden Dendritischen Zellen und (B) CD11b⁻CD45RA⁺ plasmazytoiden Dendritischen Zellen nach Differenzierung mit dem FLT3L.

Das Zytokin GM-CSF differenziert Knochenmarkszellen zu Granulozyten und myeloiden Dendritischen Zellen. Anhand der Charakterisierung von Oberflächenmarkern konnte der Anteil der Dendritischen Zellen in der Kultur festgestellt werden (Tabelle C-5), der am Tag 11 stets bei über 80% lag (Abbildung 22).

	<i>CD11c</i>	<i>CD11b</i>	<i>Gr1</i>
Granulozyten	-	+	+
mDC	+	+	-

Tabelle C-5

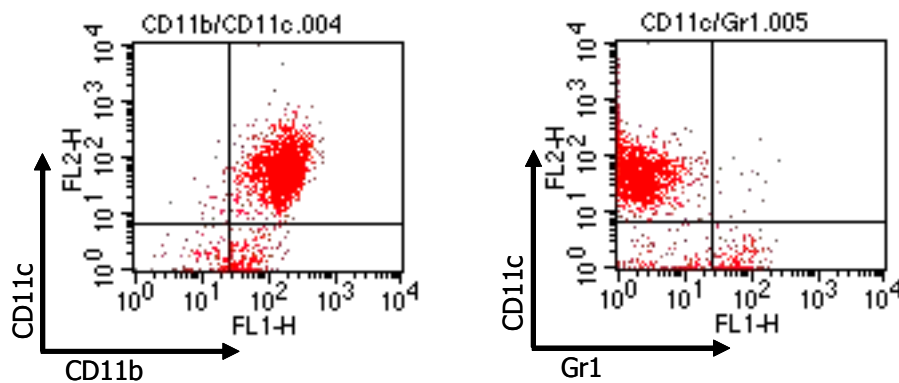


Abbildung 22: Beispiel einer Kontrollfärbung von myeloiden DC am Tag 11. Der Anteil der CD11c⁺CD11b⁺-Zellen beträgt 87%, der CD11c⁺Gr1⁻-Zellen beträgt 89%.

Die Zellen einer mit GM-CSF differenzierten Knochenmarkskultur wurden am Tag 11 mit CD11c-PE, CD11b-FITC und Gr1-FITC in den angegebenen Kombinationen mittels FACS-Analyse untersucht.

C.4.2 Expression des CGRP-Rezeptors

Von FLT3L differenzierten Knochenmarkszellen wurde am Tag 7, 10 und 14 der Kultur RNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt, um die Expression der CGRP-Rezeptorkomponenten RAMP-1, CRLR und CGRP-RCP zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass zu allen Zeitpunkten die CGRP-Rezeptorkomponenten exprimiert werden (Abbildung 23).

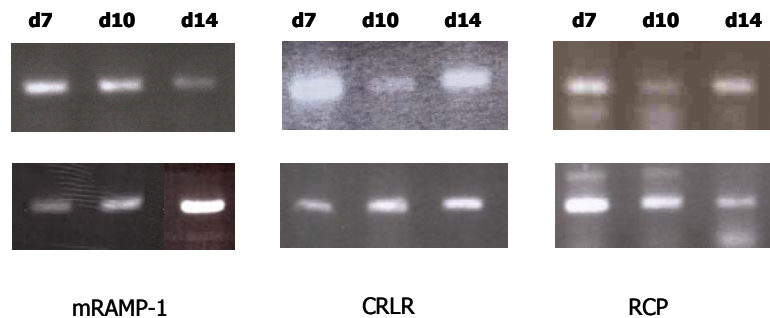


Abbildung 23: Expression der CGRP-Rezeptorkomponenten in FLT3L differenzierten Knochenmarkszellen am Tag 7, 10 und 14 der Kultur.

Von differenzierten Knochenmarkszellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten RNA isoliert und für die RT-PCR mit den entsprechenden Primerpaaren eingesetzt.

Gesortete plasmazytoide und myeloide Dendritische Zellen wurden mit CGRP stimuliert, um sie auf die Expression eines funktionellen CGRP-Rezeptors zu untersuchen.

Gereinigte myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen wurden mit 100 nM CGRP für 0, 2, 10 und 20 Minuten stimuliert. Dies resultierte in einem deutlichen Anstieg von intrazellulärem cAMP (Abbildung 24).

Diese Experimente zeigen, dass beide DC Subtypen einen funktionellen CGRP Rezeptor exprimieren und dass sich myeloide und plasmazytoide DC hinsichtlich ihrer CGRP Rezeptorexpression und Funktionalität nicht unterscheiden.

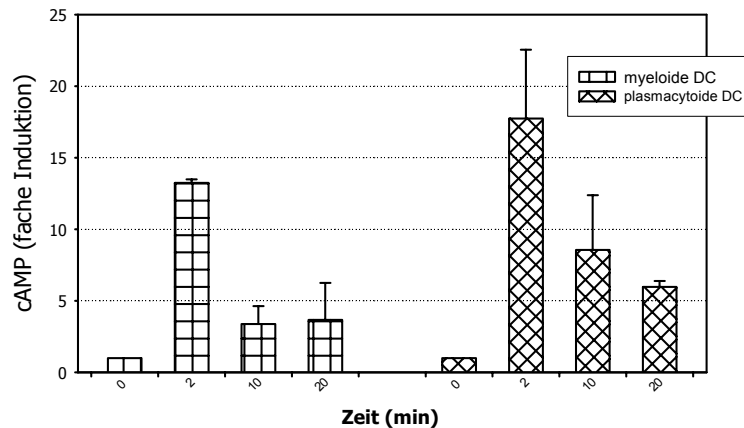


Abbildung 24: CGRP induziert erhöhte cAMP Spiegel in myeloiden und plasmazytoiden Dendritischen Zellen.

Myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 100 nM CGRP stimuliert. Anschließend wurden die zellulären cAMP-Spiegel im ELISA gemessen. Dies wurde in 3 bzw. 4 unabhängigen Experimenten gezeigt.

C.4.3 Modulation der Zyto- und Chemokinproduktion aktivierter Dendritischer Zellen mit dem Neuropeptid CGRP

Dendritische Zellen sind wichtige Zellen der angeborenen Immunität, die eine primäre Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen darstellen. Über *pattern recognition receptors* (PRR) unterscheiden sie zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Dabei spielen die Toll-like Rezeptoren (TLR) eine zentrale Rolle. Denn diese erkennen mikrobielle Strukturen, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) und übersetzen sie in zelluläre Signale, die zur Aktivierung von Dendritischen Zellen führen (Janeway *et al.*, 2002; Medzhitov *et al.*, 1997). Die Modulation der Immunfunktion von aktivierten Dendritischen Zellen durch den direkten Einfluß von CGRP wurde anhand von Zytokinen und Chemokinen als read-out einer schnellen Immunantwort untersucht.

Knochenmark abgeleitete Dendritische Zellen wurden mit Agonisten für die TLR2, 3, 4 und 9 aktiviert (Tabelle C-6). Zusätzlich wurden die Dendritischen Zellen mit CGRP stimuliert und zur Kontrolle mit dem CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇. Weiterhin wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt und eine alleinige Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Zytokine TNF- α und IL-10 sowie das Chemokine KC in den Überständen mittels ELISA gemessen. Zur Analyse immunmodulatorischer Eigenschaften Antigenpräsentierender Zellen eignen sich insbesondere die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und das antiinflammatorische

Zytokin IL-10, da diese die positive und negative Regulation in der frühen Immunantwort widerspiegeln. IL-10 supprimiert die LPS-induzierte TNF- α Produktion in Makrophagen. Dies unterstreicht die zentrale Rolle und komplexen Funktionen immunmodulatorischer Proteine.

Chemokine sind kleine chemotaktische Moleküle, die eine wichtige Rolle in Aktivierung und Regulation von Leukozyten spielen. Das Chemokin KC beeinflusst die Chemotaxis von Neutrophilen.

<i>Agonisten</i>	
TLR1/TLR2	Pam-3-Cys (P3C)
TLR3	Poly:IC (pIC)
TLR4	LPS
TLR9	CpG-DNA

Tabelle C-6

C.4.3.1 Zytokin- und Chemokinproduktion myeloider DC

Die myeloiden Dendritischen Zellen wurden mit 1 μ M CpG 2216, 10 μ g/ml P3C, 50 μ g/ml pIC bzw. 50 ng/ml LPS aktiviert.

Die Sekretion von TNF- α wurde durch CpG-DNA, P3C, pIC und LPS induziert. Nach Zugabe von CGRP wurde dies signifikant inhibiert. Kontrollstimulationen mit CGRP₈₋₃₇ zeigten, dass dieser Effekt nicht durch unspezifische Rezeptorbindung erreicht wurde. Außerdem konnte die Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ alleine keine TNF- α Produktion induzieren (Abbildung 25).

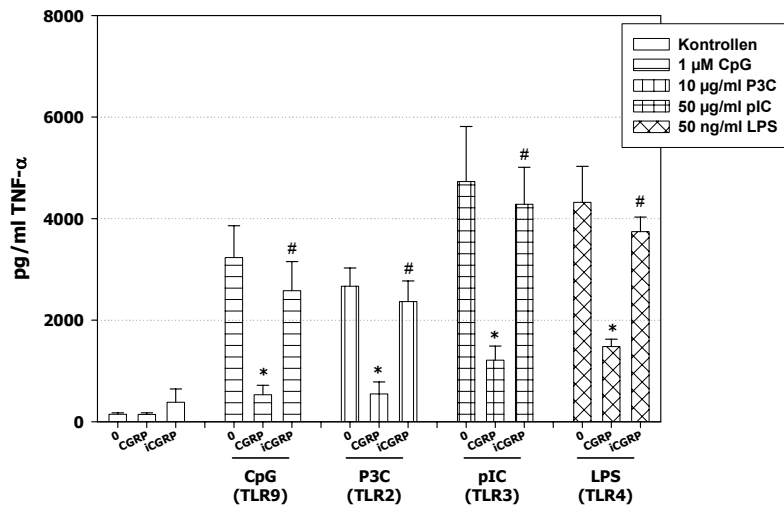


Abbildung 25: CGRP supprimiert die TNF- α -Sekretion in TLR-stimulierten myeloiden DC.

Myeloide Dendritische Zellen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Dies wurde in 7 unabhängigen Experimenten gezeigt. (*: $p < 0,05$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP; #: $p < 0,05$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP₈₋₃₇)

Sekretion des Chemokins KC wurde durch CpG-DNA, P3C, pIC und LPS induziert. Zusätzliche Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ beeinflusste die Sekretion nicht (Abbildung 26).

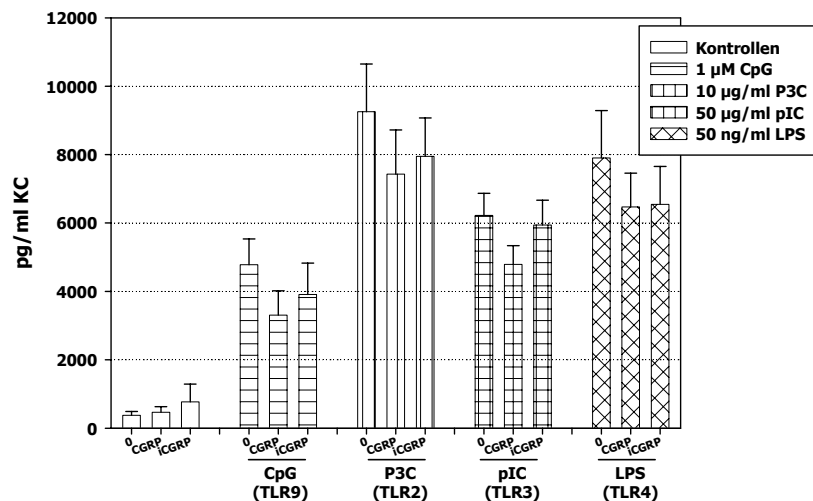


Abbildung 26: CGRP hat keinen Einfluß auf die Sekretion von KC in TLR-stimulierten myeloiden DC.

Myeloide Dendritische Zellen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Dies wurde in 7 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Sekretion des Zytokins IL-10 wurde durch CpG-DNA, P3C, pIC und LPS induziert. CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ hatten keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abbildung 27).

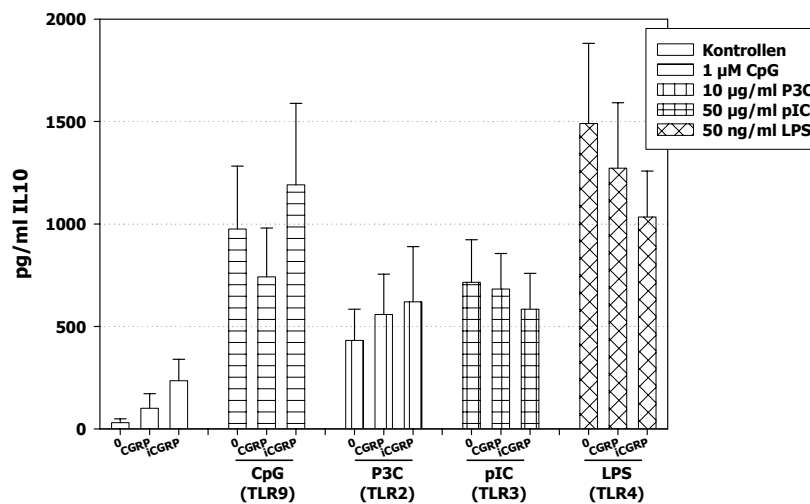


Abbildung 27: CGRP reguliert die Sekretion von IL-10 in TLR-stimulierten myeloiden DC nicht.

Myeloide Dendritische Zellen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Dies wurde in 9 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Die Zytokinproduktion von Knochenmarks-abgeleiteten myeloiden DC wurde nach Aktivierung mit Agonisten der TLR2, 3, 4 und 9 durch das Neuropeptid CGRP differenziell reguliert. Die Produktion von TNF- α wurde nach Aktivierung mit allen untersuchten Agonisten der TLRs spezifisch vermindert. CGRP zeigte jedoch keinen Einfluß auf die Sekretion von IL-10 und KC.

C.4.3.2 Modulation des Zytokins TNF- α durch CGRP

Das Neuropeptid CGRP moduliert spezifisch das Zytokin TNF- α in myeloiden DC. Dieser Effekt könnte durch eine Regulation der Transkription des *tnf- α* -Gens, der Synthese des TNF- α -Proteins, der Stabilität von TNF- α mRNA oder der TNF- α -Sekretion erfolgen. Die Translation von *tnf- α* erfolgt über einen komplexen Mechanismus, in dem die MAPKAP Kinase MK-2, die über die MAP Kinase p38 reguliert wird, und das RNA-bindende Protein TIA-1 eine wichtige Rolle spielen (Kotlyarov *et al.*, 2002, Piecyk *et al.*, 2000).

C.4.3.2.1 Einfluß von CGRP auf die TNF- α -Sekretion

Die verminderte TNF- α -Sekretion könnte einerseits durch eine verminderte Zytokinproduktion oder andererseits durch die Abspaltung von membrangebundenem TNF- α bedingt sein.

Da das Zytokin TNF- α nach der Synthese über den Golgi-Apparat an die Zytoplasmamembran transportiert wird und dort, vor der Abspaltung, zunächst in membrangebundener Form vorliegt, kann man durch eine Oberflächenfärbung membrangebundenes TNF- α im Durchflußzytometer nachweisen (Kriegler *et al.*, 1988). Brefeldin-A (Golgi Plug™) blockiert das Ausschleusen von TNF- α aus dem Golgi-Apparat und so kann man mittels einer intrazellulären Färbung tatsächlich produziertes TNF- α -Protein nachweisen.

1×10^6 Zellen wurden über Nacht mit $1 \mu\text{M}$ CpG 2216 stimuliert. Zusätzlich wurde mit 100 nM CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ inkubiert. Als Kontrollen wurden unstimulierte Zellen, sowie nur mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ stimulierte Zellen mitgeführt. Dieser Ansatz wurde mit und ohne Brefeldin A durchgeführt. Während von dem Ansatz ohne Brefeldin A eine Oberflächenfärbung gegen TNF- α durchgeführt wurde, wurde der Ansatz mit Brefeldin A für eine intrazelluläre Färbung verwendet.

Abbildung 28 zeigt eine intrazelluläre Färbung von aktivierten myeloiden Dendritischen Zellen, die 12 Stunden mit Brefeldin A inkubiert wurden. Nach Stimulation mit CpG 2216 konnte eine erhöhte Produktion von intrazellulärem TNF- α , im Vergleich zu Zellen, die zusätzlich mit CGRP oder CGRP₈₋₃₇ stimuliert wurden, detektiert werden. Bei den Kontrollen wurde kein TNF- α detektiert.

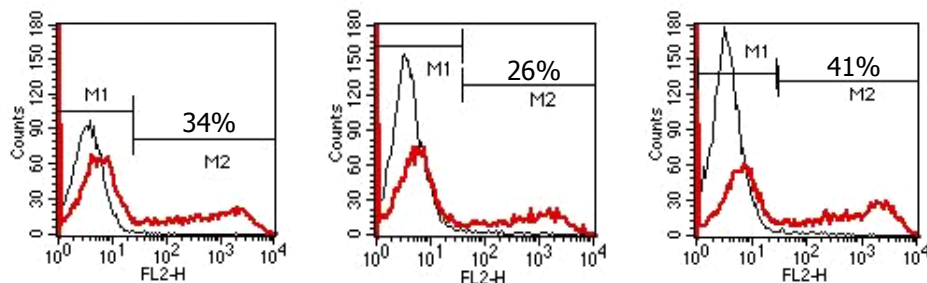


Abbildung 28: CpG 2216 aktivierte und mit Brefeldin A inkubierte myeloide Dendritische Zellen produzieren größere Mengen an intrazellulärem TNF- α , im Vergleich zu Zellen, die zusätzlich mit CGRP oder CGRP₈₋₃₇ stimuliert wurden.

Intrazelluläre FACS-Analyse von myeloiden Dendritischen Zellen, die über Nacht mit Brefeldin A inkubiert waren und mit $1 \mu\text{M}$ CpG 2216, 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert wurden (links: CpG 2216, mitte: CpG 2216 + CGRP, rechts: CpG 2216 + CGRP₈₋₃₇). Gezeigt ist eines von vier repräsentativen Ergebnissen.

Abbildung 29 fasst drei Experimente zusammen und zeigt, dass nach Stimulation mit CGRP und CpG 2216 signifikant weniger TNF- α produziert wird als nach Aktivierung mit CpG 2216 alleine.

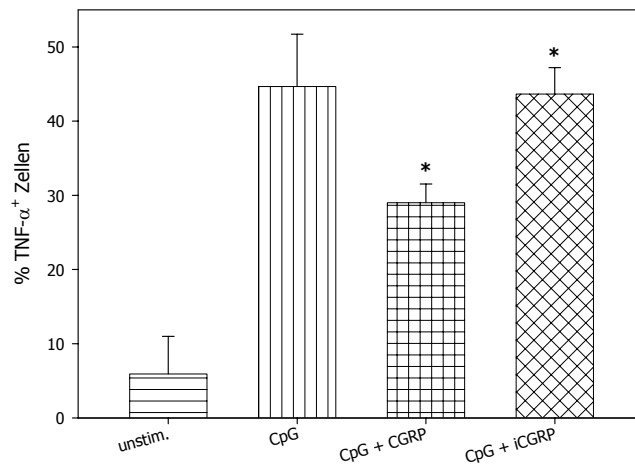


Abbildung 29: CpG 2216 aktivierte myeloide Dendritische Zellen produzieren größere Mengen an intrazellulärem TNF- α , im Vergleich zu Zellen, die zusätzlich mit CGRP oder CGRP₈₋₃₇ stimuliert wurden. Der Graph fasst die Ergebnisse von vier unabhängigen intrazellulären Färbungen zusammen. ($p < 0,05$, wobei CpG gegen CpG + CGRP).

Die Oberflächenfärbung gegen TNF- α zeigt, daß das durch CpG 2216 induzierte TNF- α nicht membrangebunden vorliegt (Abbildung 30).

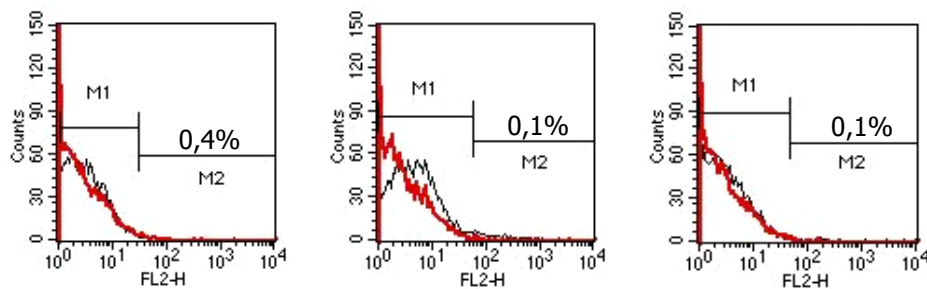


Abbildung 30: CpG 2216 aktivierte myeloide Dendritische Zellen weisen mit und ohne CGRP und CGRP₈₋₃₇ kein membrangebundenes TNF- α auf.

Oberflächenfärbung von myeloiden Dendritischen Zellen, die über Nacht mit 1 μ M CpG 2216, 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ in stimuliert wurden (links: CpG 2216, mitte: CpG 2216 + CGRP, rechts: CpG 2216 + CGRP₈₋₃₇). Die Zellen wurden mit TNF- α -PE (1:2000) gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Gezeigt ist eines von 3 repräsentativen Ergebnissen.

Die im ELISA festgestellte Suppression von TNF- α in CpG 2216-aktivierten myeloiden Dendritischen Zellen durch CGRP, ist in der verminderten Produktion von TNF- α begründet, und nicht in einer verminderten Sekretion, denn TNF- α wurde mittels einer FACS-Analyse nicht als oberflächengebunden nachgewiesen.

C.4.3.2.2 Der Einfluss von CGRP auf die Transkription von *tnf-α* in aktivierten myeloiden DC

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass das Neuropeptid CGRP die TNF- α -Produktion in mit TLR-Liganden stimulierten myeloiden DC signifikant supprimiert. Eine verminderte Sekretion, bedingt durch das Vorliegen von membrangebundenem TNF- α konnte ausgeschlossen werden. Somit könnte die geringere TNF- α -Produktion durch eine geringere Synthese von TNF- α begründet sein.

Um zu überprüfen, ob CGRP die Transkription von *tnf-α* moduliert, also eine Modulation auf dem Level der mRNA stattfindet, wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B über die Degradierung von I κ B α analysiert. NF- κ B wird im Zytoplasma durch den Inhibitor I κ B α blockiert. I κ B α kann über IKK Kinasen phosphoryliert und anschließend degradiert werden. Dies führt zur Aktivierung von NF- κ B, indem die p65 Untereinheit nun in den Nukleus translozieren kann, um dort als Transkriptionsfaktor zu agieren.

Knochenmark-abgeleitete myeloide DC wurden mit CpG 2216 aktiviert und zusätzlich mit CGRP stimuliert. Es wurde außerdem eine Kontrollstimulation mit dem CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇, eine alleinige Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ sowie eine Mediumkontrolle durchgeführt. Nach 10, 40 und 60 Minuten wurden die Zellen geerntet und lysiert, um Komponenten des Zytoskeletts und die Nuklei abzutrennen. Die Proteinlösung wurde für die Western Blot Analyse eingesetzt, in der mittels eines spezifischen Antikörpers gegen I κ B α dessen Degradierung nachgewiesen werden konnte.

Auswertung des Western Blots zeigt, dass I κ B α sowohl in CpG 2216 aktivierten myeloiden Dendritischen Zellen degradiert wurde, als auch in zusätzlich mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ stimulierten Zellen (Abbildung 31). Dies zeigt, dass NF- κ B, das die Transkription von TNF- α reguliert, unabhängig von dem Neuropeptid CGRP in CpG 2216 stimulierten myeloiden DC aktiviert wird.

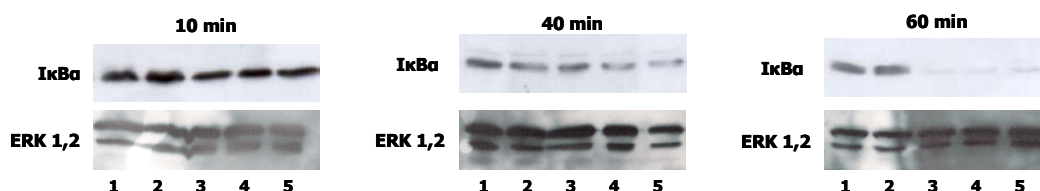


Abbildung 31: CGRP hat keinen Einfluss auf die Degradierung der I κ B α -Kinase in CpG 2216 aktivierten myeloiden DC.

Myeloide Dendritische Zellen wurden für 10, 40 und 60 Minuten mit 1 μ M CpG 2216 aktiviert und zusätzlich mit 100 nM CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇. I κ B α wurde mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen, als Beladungskontrolle wurde ERK 1,2 eingesetzt. Die Abbildung repräsentiert eines von

drei vergleichbaren Experimenten. (1: CGRP; 2: CGRP₈₋₃₇; 3: CpG 2216; 4: CpG 2216 + CGRP; 5: CpG 2216 + CGRP₈₋₃₇)

C.4.3.2.3 Bestimmung der TNF- α -mRNA-Levels

Da die NF- κ B-Aktivierung in CpG 2216 aktivierten myeloiden DC unabhängig von CGRP erfolgt, wurden die mRNA-Mengen mittels semiquantitativer PCR überprüft. Dabei wurde das Verhältnis der TNF- α -mRNA von CpG 2216 aktivierten myeloiden Dendritischen Zellen zur β -Aktin-mRNA mittels TaqMan PCR bestimmt. Die Aktivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 3 Stunden.

Stimulation mit CpG 2216 führte zu einem signifikanten Anstieg der TNF- α -mRNA. Zusätzliche Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ führte zu keiner Veränderung der mRNA Konzentration (Abbildung 32).

Zusammen gefasst zeigen die Befunde deutlich, dass *tnf- α* in CpG 2216 aktivierten myeloiden DC unabhängig von dem Neuropeptid CGRP transkribiert wird, dass also die Suppression der TNF- α -Produktion nicht über eine Regulation der mRNA-Spiegel stattfindet.

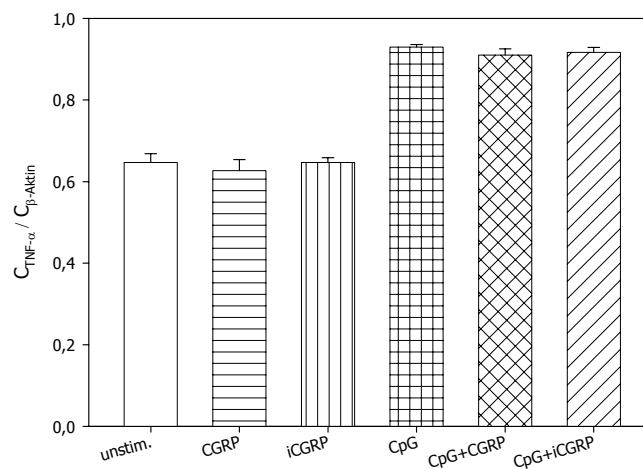


Abbildung 32: CpG 2216 aktivierte myeloide dendritische Zellen weisen ähnliche TNF- α -mRNA-Mengen auf wie CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ stimulierte aktivierte myeloide Dendritische Zellen.

Myeloide Dendritische Zellen wurden mit 1 μ M CpG 2216, 100 nM CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ in den angegebenen Kombinationen drei Stunden stimuliert. Nach Isolierung der mRNA und der cDNA Synthese wurde die TaqMan PCR durchgeführt. Die Abbildung spiegelt die Anzahl der Zyklen in der PCR Reaktion wieder, die nach Überschreitung des Threshold Zyklus (C_t) durchlaufen wurden. Dabei wurde das Verhältnis aus $C_{TNF-\alpha}$ und $C_{\beta-Aktin}$ gebildet. Aktivierte myeloide Dendritische Zellen (+/- CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇) weisen im Verhältnis zu β -Aktin eine höhere Konzentration an TNF- α -mRNA auf, so dass nach wenigen Zyklen in der PCR der Threshold überschritten wurde. Der Graph fasst 3 unabhängige Experimente zusammen.

C.4.3.2.4 Regulation der TNF- α -Proteinsynthese

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass das Neuropeptid CGRP die TNF- α -Produktion in mit TLR-Liganden stimulierten myeloiden DC signifikant supprimiert. Dem lag eine geringere Synthese von TNF- α zu Grunde und nicht etwa eine verminderte Sekretion bedingt durch das Vorliegen von membrangebundenem TNF- α . Analyse der I κ B α -Degradierung sowie Quantifizierung der TNF- α -mRNA machten deutlich, dass zwar weniger TNF- α -Protein synthetisiert wurde, die Menge der transkribierten TNF- α -mRNA jedoch nicht auf Grund eines Defekts im I κ B α - Signaling vermindert war.

Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, über welche Mechanismen die Translation der TNF- α -mRNA reguliert werden könnte.

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) sind Bestandteile eines zentralen Signaltransduktionsweges, der extrazelluläre Signale in intrazelluläre Signale umsetzt. Bisher sind drei MAPK Signaltransduktionswege bekannt, die über *extracellular signal-regulated kinases 1 und 2* (ERK1,2), *c-jun-N-terminal kinase 1* (JNK1) und p38 vermittelt werden. ERK1,2, JNK1 und p38 werden durch duale Phosphorylierung von Thr- und Tyr-Resten über MAPK Kinasen (MAPKK) aktiviert. Die MAPKK wiederum werden über Ser/Thr-Kinasen aktiviert, die sogenannten MAPKK Kinasen (MAPKKK).

Die Substrate aktivierter MAPK sind zytosolische Proteine und Transkriptionsfaktoren, über die Prozesse wie Apoptose, Proliferation und die Expression von Genen reguliert werden (Kumar *et al.*, 2003).

Die Proteinbiosynthese von TNF- α wird auf posttranskriptionaler Ebene über die MAP Kinasen ERK 1,2 und p38 reguliert. Dabei steuern Tpl2/ERK-Signale über den nukleozytoplasmatischen Transport der TNF- α -mRNA die Proteinmenge (Dumitru *et al.*, 2000) und p38 kontrolliert die Translation der TNF- α -mRNA über das RNA-bindende Protein TIA-1 (Piecny *et al.*, 2000).

Da CGRP die Expression von TNF- α reguliert, wurde der Effekt von CGRP auf die Aktivierung von p38 und ERK1,2 untersucht (Abbildung 33).

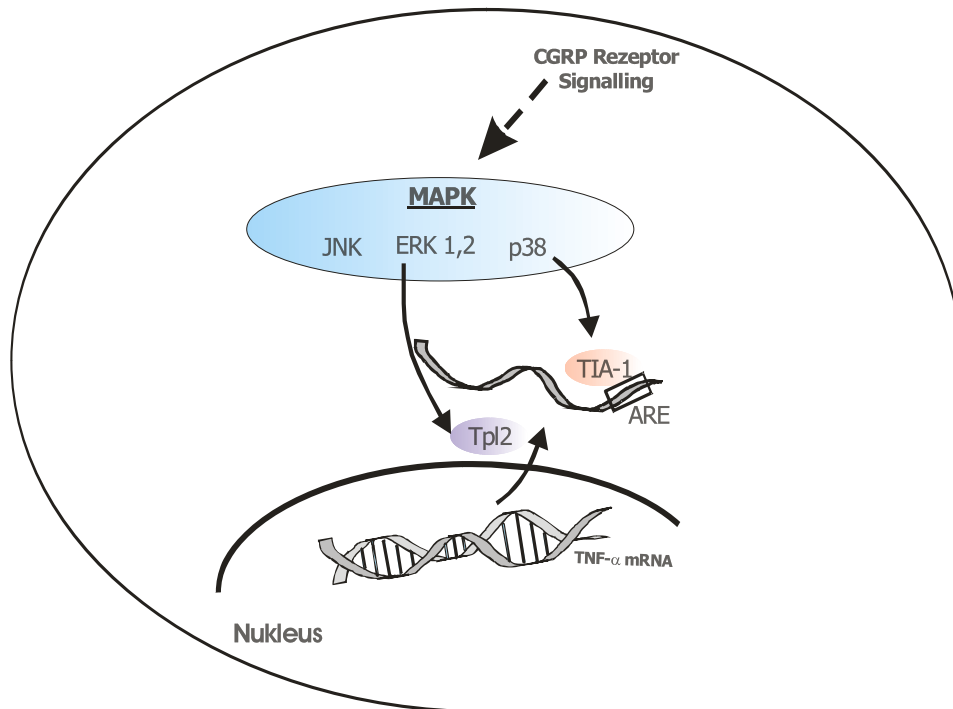


Abbildung 33: Möglicher Einfluss des CGRP-Signallings auf die MAPK und auf die Expression von TNF- α -Protein.

Knochenmark-abgeleitete myeloide DC wurden mit CpG 2216 aktiviert und zusätzlich mit CGRP stimuliert. Es wurde außerdem eine Kontrollstimulation mit dem CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇, eine alleinige Stimulation mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ sowie eine Mediumkontrolle durchgeführt. Nach 10, 40 und 60 Minuten wurden die Zellen geerntet und lysiert, um Komponenten des Zytoskeletts und die Nuklei abzutrennen. Die Proteinlösung wurde für die Western Blot Analyse eingesetzt, in der mittels spezifischer Antikörper die Phosphorylierung von p38 und ERK 1,2 nachgewiesen wurde.

Aktivierung von myeloiden DC mit CpG 2216 führte zu einer starken Phosphorylierung der MAPK p38. Die densitometrische Auswertung des Western Blots zeigte, dass CGRP diesen Effekt deutlich vermindern konnte. Die Kontrolle mit CGRP₈₋₃₇ zeigte, dass dieser Effekt spezifisch war (Abbildung 34A). CpG 2216 induzierte eine starke Phosphorylierung der MAPK ERK 1,2. CGRP veränderte die durch CpG 2216 induzierte Aktivierung von ERK 1,2 jedoch nicht (Abbildung 34B).

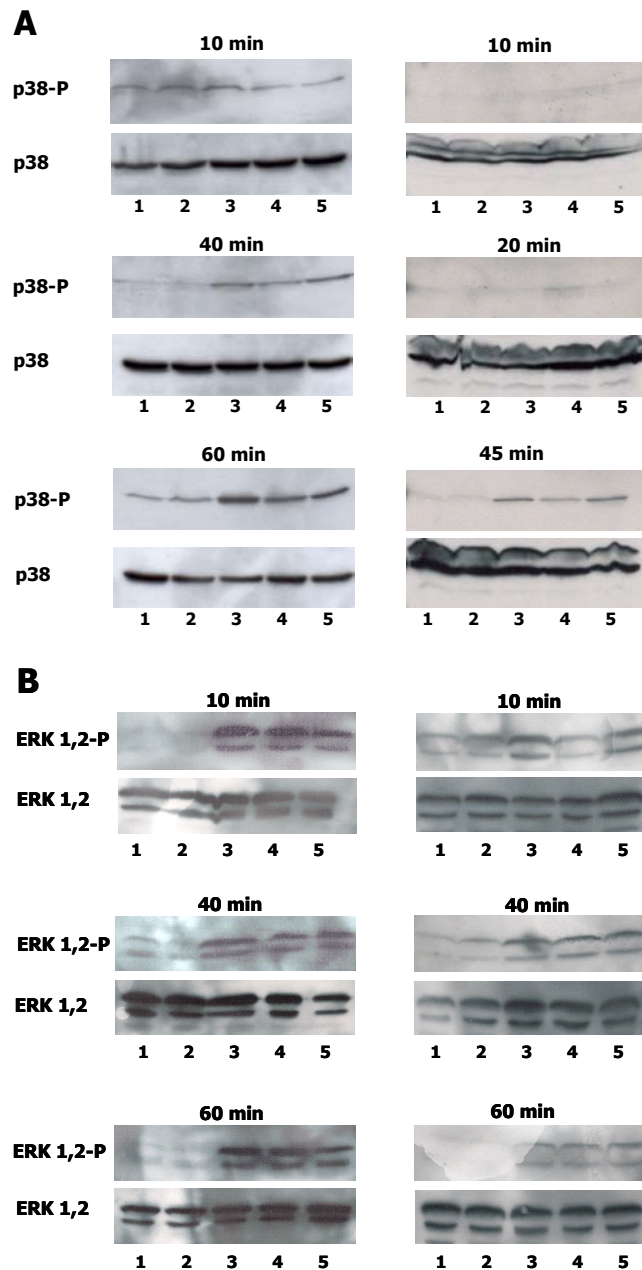


Abbildung 34: CGRP supprimiert die Phosphorylierung der MAPK p38, hat jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der MAPK ERK 1,2 in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC.

Myeloide Dendritische Zellen wurden für 10, 40 und 60 Minuten bzw. 10, 20 und 45 Minuten mit 1 μ M CpG 2216 aktiviert und zusätzlich mit 100 nM CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇. Die MAPK p38, deren Phosphorylierung (A) sowie die MAPK ERK 1,2, und deren Phosphorylierung (B) wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen und anschließend densitometrisch ausgewertet. Die Abbildung repräsentiert eines von drei vergleichbaren Experimenten. (1: CGRP; 2: CGRP₈₋₃₇; 3: CpG 2216; 4: CpG 2216 + CGRP; 5: CpG 2216 + CGRP₈₋₃₇).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verminderte TNF- α -Proteinmenge über eine Regulation der Translation der TNF- α -mRNA stattfindet, und dass die Aktivierung der MAPK p38 durch CGRP unterdrückt wird.

C.4.3.3 Zytokinproduktion plasmazytoider DC

Plasmazytoide und myeloide DC unterscheiden sich nicht nur in der Expression ihrer Oberflächenmoleküle, sondern auch in ihren funktionellen Charakteristika. So sind die plasmazytoiden DC wichtige Produzenten von Typ I Interferonen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Neuropeptids CGRP auf myeloide und plasmazytoide DC untersucht, um dabei mögliche Unterschiede in ihrer Immunfunktion zu evaluieren.

Plasmazytoide Dendritische Zellen exprimieren die Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 nicht, so dass in den folgenden Experimenten nur mit dem TLR9-Agonisten CpG 2216 stimuliert wurde.

Stimulation plasmazytoider Dendritischer Zellen mit CpG-DNA induzierte große Mengen an IFN- α , dessen Sekretion aber nicht durch CGRP beeinflusst wurde (Abbildung 35).

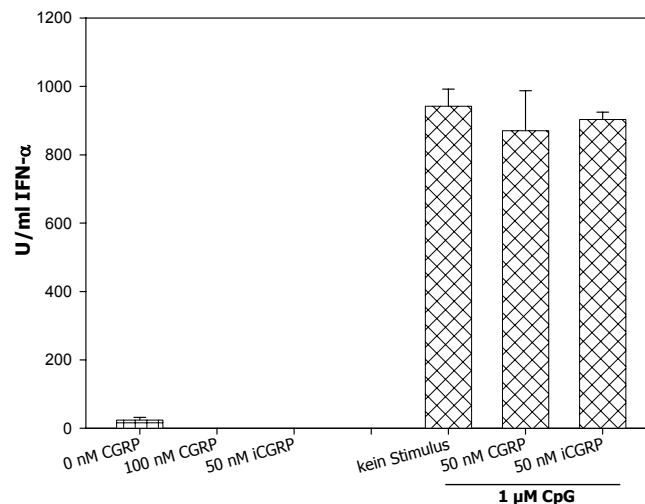


Abbildung 35: CGRP zeigt keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN- α , in CpG-DNA stimulierten plasmazytoiden DC.

Plasmazytoide Dendritische Zellen wurden über Nacht mit den angegebenen Kombinationen von CGRP, CGRP₈₋₃₇ bzw. CpG 2216 stimuliert. Der Graph repräsentiert 3 unabhängige Experimente.

CpG 2216 aktivierte plasmazytoide DC produzierten geringere Mengen an TNF- α im Vergleich zu myeloiden DC und diese wurden auch nicht durch CGRP moduliert (Abbildung 36).

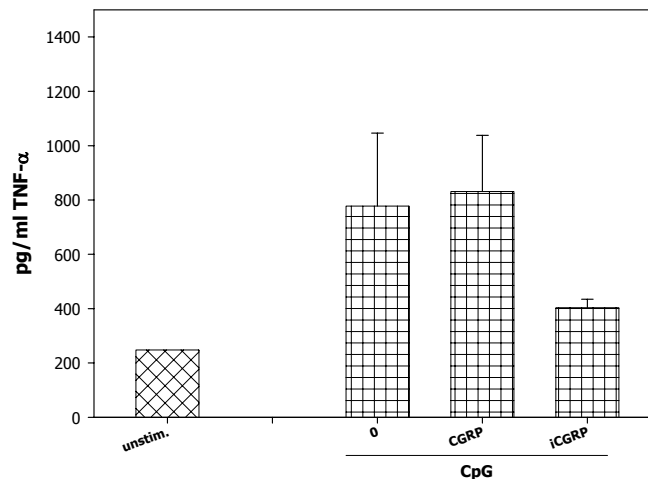


Abbildung 36: CGRP zeigt keinen Einfluss auf die Sekretion von TNF- α , in CpG-DNA-stimulierten plasmazytoiden DC.

Plasmazytoide Dendritische Zellen wurden über Nacht mit den angegebenen Kombinationen von CGRP, CGRP₈₋₃₇ bzw. CpG 2216 stimuliert. Der Graph repräsentiert 3 unabhängige Experimente.

C.4.4 Die Bedeutung von CGRP in der Aktivierung von Thioglykollat-induzierten Makrophagen

Neben den Dendritischen Zellen zählen die Makrophagen zu den Antigenpräsentierenden Zellen. Häcker *et al.* (1999) konnten zeigen, dass MAP-Kinasen in Antigenpräsentierenden Zellen nach CpG-DNA-Stimulation unterschiedlich aktiviert werden. So führt die Aktivierung von Dendritischen Zellen, die große Mengen an IL-12 produzieren, mit CpG-DNA zu keiner Aktivierung von ERK 1,2. In Makrophagen dagegen führt die Aktivierung mit CpG-DNA zu einer Aktivierung von ERK 1,2. Dieser Pathway erhöht die Synthese von TNF- α und erniedrigt die Synthese von IL-12.

Basierend auf dieser Aussage wurde untersucht, inwiefern das Neuropeptid CGRP die Zytokin- und Chemokinproduktion von aktivierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen moduliert.

C.4.4.1 Expression des CGRP-Rezeptors in Thioglykollat-induzierten Makrophagen

Die isolierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen wurden zunächst auf die Expression eines funktionellen CGRP-Rezeptors untersucht.

Die Peritonealmakrophagen wurden für 0, 2, 10 und 20 Minuten mit 100 nM CGRP stimuliert. Dies resultierte in einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels um zirka

das 2,5 fache (Abbildung 37), die aber verglichen mit den Dendritischen Zellen insgesamt schwächer war.

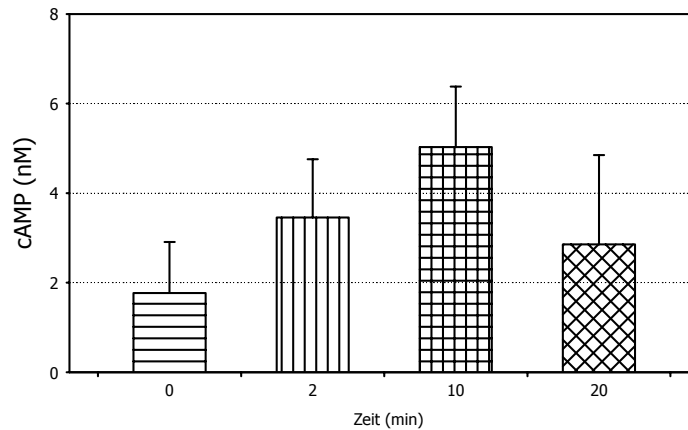


Abbildung 37: CGRP induziert erhöhte cAMP Levels in Thioglykollat-Makrophagen.

Thioglykollat-induzierte Makrophagen wurden für die angegebenen Zeiträume mit 100 nM CGRP stimuliert. Die zellulären cAMP-Spiegel wurden mittels ELISA gemessen. Die Abbildung fasst drei repräsentative Experimente zusammen.

C.4.4.2 Modulation von aktivierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen mit CGRP

Analog der Stimulation von Dendritischen Zellen mit TLR-Agonisten, wurde der Frage nachgegangen, ob das Neuropeptid CGRP die Immunfunktion aktivierter Makrophagen moduliert. Als read-out wurde die Produktion von Zytokinen und Chemokinen analysiert. Adhäsionsaufgereinigte Thioglykollat-induzierte Makrophagen wurden mit 1 μ M CpG 2216, 10 μ g/ml P3C, 50 μ g/ml pIC bzw. 50 ng/ml LPS stimuliert. Außerdem wurden 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ zugegeben. Als Kontrolle wurde eine Mediumprobe mitgeführt und sowohl mit CGRP als auch mit 100 nM CGRP₈₋₃₇, als Kontrolle für unspezifische Rezeptorbindung, stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zytokine und Chemokine in den Überständen mittels ELISA gemessen.

Die Sekretion von TNF- α wurde durch alle Agonisten induziert und konnte durch Zugabe von CGRP signifikant inhibiert werden. Kontrollstimulationen mit CGRP₈₋₃₇ zeigten, dass dieser Effekt durch spezifische Rezeptorbindung vermittelt wurde, und dass Stimulationen mit CGRP bzw. CGRP₈₋₃₇ alleine keine TNF- α -Produktion induzieren konnten (Abbildung 38).

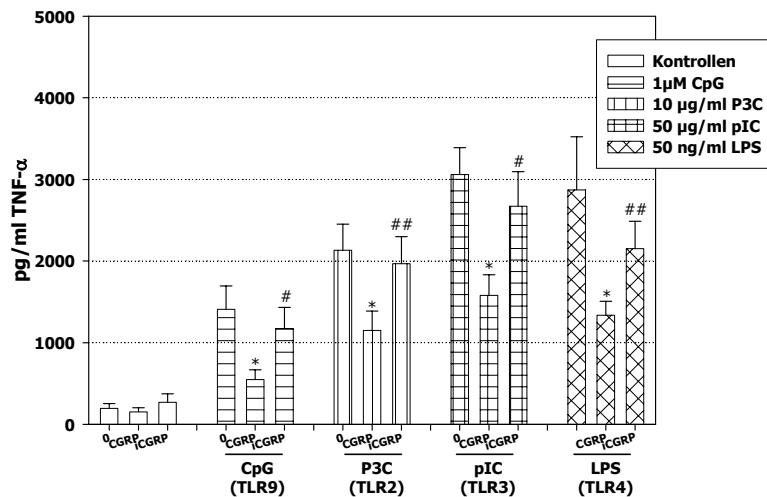


Abbildung 38: CGRP supprimiert die TNF- α -Sekretion in TLR-stimulierten Thioglykollat-Makrophagen. Thioglykollat-induzierte Makrophagen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Der Graph fasst 6 bzw. 9 unabhängige Experimente zusammen. (*: $p < 0,05$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP; #: $p < 0,05$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP₈₋₃₇; ##: $p < 0,06$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP₈₋₃₇)

Das Chemokin MCP-1/JE wurde in Thioglykollat-induzierten Makrophagen durch CpG 2216 und P3C induziert. Gleichzeitige Stimulation mit CGRP hatte keinen Einfluss auf die MCP-1/JE-Sekretion aktivierter Zellen (Abbildung 39). In diesem Zusammenhang wurden auch myeloide Dendritische Zellen auf die Sekretion von MCP-1/JE untersucht. Nach Aktivierung mit CpG-DNA zeigten sie eine stärkere Induktion der Chemokinsekretion, die jedoch durch die gleichzeitige Stimulation mit CGRP nicht signifikant supprimiert wurde. P3C induzierte in den myeloiden DC im Gegensatz zu den Thioglykollat-induzierten Makrophagen kein MCP-1/JE.

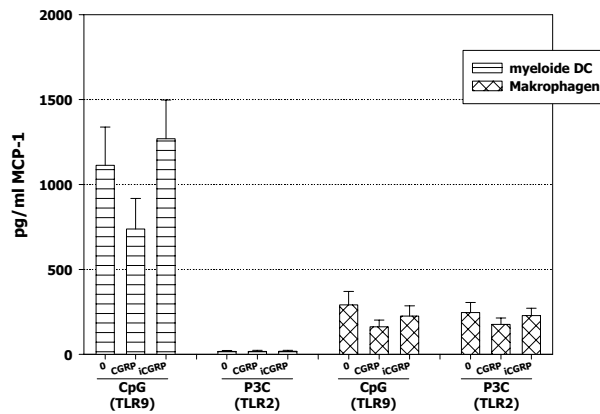


Abbildung 39: CGRP reguliert die Sekretion von MCP-1/JE in TLR-stimulierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen nicht. P3C induziert in myeloiden DC nicht die Sekretion von MCP-1/JE.

Thioglykollat-induzierte Makrophagen und myeloide DC wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Der Graph fasst 6 bzw. 10 unabhängige Experimente zusammen.

Die Sekretion des Chemokins KC wurde durch CpG-DNA, P3C, pIC und LPS induziert. Zusätzliche Stimulation mit CGRP suppressierte die Sekretion von KC in CpG und pIC aktivierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen signifikant. Die KC-Produktion von P3C und LPS aktivierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen wurde durch CGRP nicht moduliert (Abbildung 40).

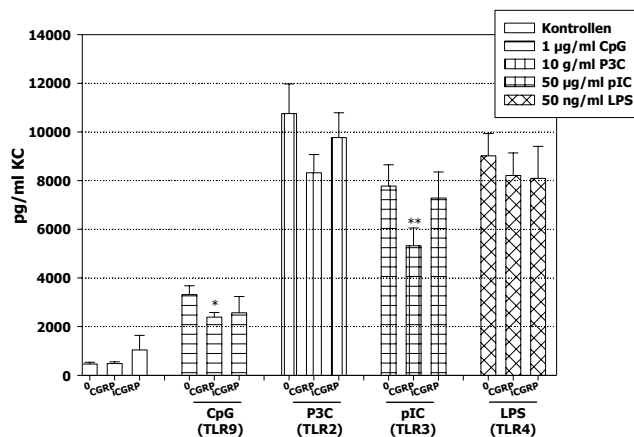


Abbildung 40: CGRP reguliert die Sekretion von KC in TLR-stimulierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen nicht.

Thioglykollat-induzierte Makrophagen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Der Graph fasst 7 unabhängige Experimente zusammen. (*: $p < 0,05$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP; **: $p < 0,06$, wobei TLR-Agonist gegen TLR-Agonist + CGRP₈₋₃₇)

Sekretion des Zytokins IL-10 wurde durch CpG-DNA, P3C, pIC und LPS induziert. CGRP hatte keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion (Abbildung 41).

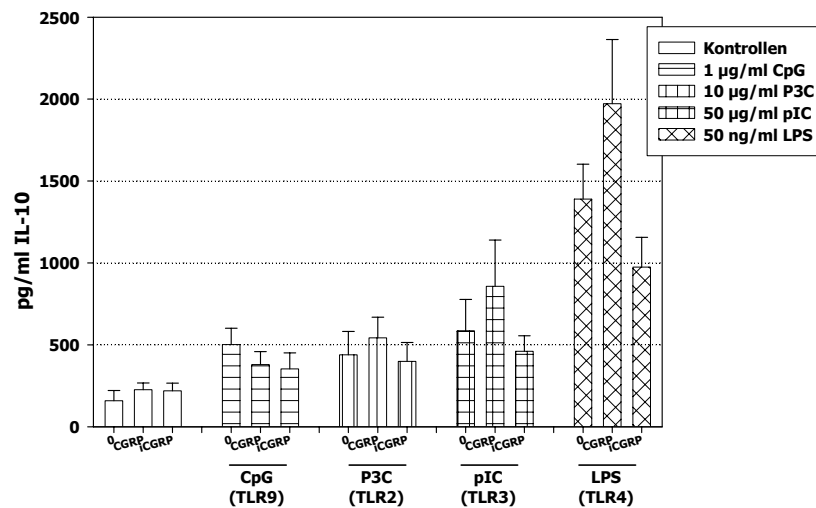


Abbildung 41: CGRP reguliert die Sekretion von IL-10 in TLR-stimulierten Thioglykollat-induzierte Makrophagen nicht.

Thioglykollat-induzierte Makrophagen wurden für 24 Stunden mit TLR-Agonisten in den angegebenen Konzentrationen aktiviert und ± 100 nM CGRP bzw. 100 nM CGRP₈₋₃₇ stimuliert. Der Graph fasst 7 unabhängige Experimente zusammen.

Die Zytokinproduktion adhäsionsaufgereinigter Thioglykollat-induzierter Makrophagen wurde nach Aktivierung mit Agonisten der TLR2, 3, 4 und 9 durch das Neuropeptid CGRP differenziell reguliert. Die Produktion von TNF- α wurde nach Aktivierung mit allen untersuchten Agonisten der TLR spezifisch vermindert. Die Sekretion von MCP-1/JE wurde in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC und Thioglykollat-induzierten Makrophagen zwar induziert, jedoch durch CGRP nicht spezifisch supprimiert. P3C induzierte die Sekretion von MCP-1/JE in Thioglykollat-Makrophagen, in jedoch myeloiden DC jedoch nicht. Die Sekretion von KC wurde in CpG 2216 und pIC aktivierten Thioglykollat-induzierten Makrophagen durch CGRP supprimiert. CGRP zeigte jedoch keinen Einfluß auf die Sekretion von IL-10.

D: Diskussion

D.1 Mögliche Funktion des CGRP Rezeptorkomplexes in der Hämatopoese beim Menschen

CGRP und andere Neuropeptide wurden in Nervenfasern nachgewiesen, die an primären lymphoiden Organen und im Knochenmark enden (Hosoi *et al.*, 1993; Weihe *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 1990). Die Bedeutung von Neuropeptiden in der Hämatopoese wurde in verschiedenen Studien beschrieben. So führte die Depletion von Neuropeptiden zu einer Suppression der Hämatopoese. Insbesondere das Neuropeptid CGRP wurde mit der Myelopoese assoziiert, da es einen direkten stimulatorischen Effekt auf myeloide Progenitorzellen der Maus besitzt (Broome *et al.*, 2000; Afan *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde das Verständnis für die Bedeutung von Neuropeptiden in der Hämatopoese beim Menschen weiter vertieft.

Die CGRP-Rezeptorkomponenten RAMP-1 und CRLR werden in humanen CD34⁺-Progenitorzellen und in Granulozyten differenziell exprimiert. Während der humanen Granulopoese kommt es sowohl zu einem strukturellen als auch funktionellen Verlust des CGRP-Rezeptors. *In vitro* erhöht CGRP selektiv die Anzahl granulo-monozytärer Vorläuferzellen und fördert somit die Granulopoese humaner CD34⁺-Zellen.

Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten, die zeigen, dass murine Knochenmarkszellen etwa 3000 hochaffine CGRP Bindungsstellen pro Zelle besitzen (Mullins *et al.*, 1993). Sowohl die Zellpopulationen, die den CGRP-Rezeptor exprimieren, als auch die Struktur des Rezeptors wurden nicht weiter charakterisiert. Da die in vorliegender Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass nur ein Teil der Knochenmarkszellen, nämlich die CD34⁺-Progenitorzellen, den CGRP-Rezeptor besitzen, könnte die Anzahl der CGRP-Rezeptoren pro Zelle erheblich höher sein.

Die regulierte Expression des CGRP-Rezeptors auf hämatopoetischen Vorläuferzellen ist im Einklang mit dem Befund, dass CGRP in Nervenendigungen des Knochenmarksparenchyms zu finden ist (Weihe *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 1990) und somit die Funktion hämatopoetischer Zellen direkt beeinflussen könnte.

Durch Behandlung mit Capsaicin kann man *in vivo* Neuropeptide depletieren. Auf diese Weise wurden in Mäusen die Neuropeptide CGRP und Substanz P depletiert, was zu einer verminderten Produktion von Neutrophilen führte. Beide Neuropeptide erhöhen die Anzahl granulo-monozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark signifikant, wobei nur CGRP einen direkten Effekt auf angereicherte Progenitorzellen hatte (Broome *et al.*, 2000). Substanz P hat möglicherweise eher einen indirekten Effekt auf die Granulopoese, in dem es lösliche Faktoren

aus den Knochenmarksstromazellen freisetzt (Rameshwar *et al.*, 1995). Obwohl die hämatopoetische Aktivität der beiden Neuropeptide CGRP und Substanz P gezeigt wurde, wurden bisher nicht die Rezeptoren identifiziert, über die diese Effekte vermittelt werden.

In dieser Arbeit wurden die bisherigen Daten zur Relevanz von CGRP in der Hämatopoese verifiziert und noch erweitert. Es wurde gezeigt, dass die Expression von RAMP-1, CRLR und CGRP-RCP bei CD34⁺-Progenitorzellen direkt mit einem funktionellen CGRP-Rezeptor assoziiert ist. Der Verlust von RAMP-1 und CRLR während der *in vitro* Granulopoese korreliert mit dem Verlust der CGRP Responsivität. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass CGRP nicht nur an gereinigte CD34⁺-Zellen bindet, sondern auch an der Bildung granulo-monozytärer Vorläuferzellen beteiligt ist. Inkubation mit CGRP führte zu einer erhöhten Anzahl granulo-monozytärer Vorläuferzellen, obwohl die CD34⁺-Zellen mit der optimalen Konzentration der Wachstumsfaktoren inkubiert wurden, die granulomonozytische Differenzierung ermöglichen. Desweiteren wurde nachgewiesen, dass humane Knochenmarksstromazellen auf CGRP Stimulation nicht mit einer cAMP-Erhöhung reagieren, also keinen funktionellen CGRP-Rezeptor aufweisen. Deswegen erscheint es unwahrscheinlich, dass die Effekte von CGRP über eine Stimulation von Knochenmarksstromazellen vermittelt werden.

Diese Arbeit bestätigt zusammen mit anderen Studien, dass neuroendokrine Mechanismen einen wichtigen Effekt auf die Hämatopoese haben und dass CGRP ein wichtiges Element ist, um neuronale Impulse zur Differenzierung von Granulozyten umzusetzen.

D.2 Mögliche Funktion von RAMP-1 in der murinen Hämatopoese

Die Relevanz von CGRP und dessen Rezeptor in der humanen Granulopoese wurde im vorangegangenen Kapitel durch *in vitro* Experimente gezeigt. Die wichtige modulative Funktion von CGRP wurde in einem murinen *in vivo* System überprüft.

Dazu wurde RAMP-1 zunächst in einen retroviralen Vektor kloniert, mit welchem Knochenmarkszellen infiziert wurden, um anschließend in Balb/c-Mäuse transferiert zu werden. Durch die Überexpression der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 konnte die Rolle von RAMP-1 in der Rekonstitution und Entwicklung hämatopoetischer Lineages untersucht werden.

Die Überexpression von RAMP-1 in Knochenmarkszellen durch retroviralen Gentransfer zeigte, dass Milzzellen von Mäusen mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark nach CGRP-Reiz mit einem deutlichen Anstieg intrazellulärer cAMP-Spiegel reagierten, verglichen mit Milzzellen der Kontrollmäuse. RAMP-1 transduzierte Knochenmarkszellen führten also nach Rekonstitution der Balb/c-Mäuse zu einer erhöhten Aktivität des CGRP-Rezeptors.

RAMP-1 überexprimierende Zellen in peripherem Blut, Milz und Knochenmark zeigten keinen veränderten Beitrag zur Rekonstitution und Entwicklung hämatopoetischer Linien, verglichen mit der Kontrollgruppe. So waren weder die Rekonstitution der myeloiden, noch der B- und T-Zell-Lineages verändert. In der Rekonstitutionseffizienz wurden Unterschiede zwischen den hämatopoetischen Linien beobachtet, die jedoch durch die unterschiedliche *in vitro* Transduktionseffizienz erklärt werden konnten. Das kurzzeitige Homing der transduzierten Knochenmarkszellen in das Empfänger Knochenmark war nicht signifikant verändert.

Der CGRP-Rezeptor besteht aus einem Heterodimer aus RAMP-1 und CRLR, wobei beide Rezeptorkomponenten im gleichen Verhältnis exprimiert sind. Es ist möglich, dass die Überexpression von RAMP-1 alleine zu keiner Veränderung der Hämatopoese führt, da eine alleinige Überexpression von RAMP-1 nicht zwangsläufig zu einer verstärkten Rezeptorexpression führt. Wird RAMP-1 alleine exprimiert, liegt es nicht in der Zytoplasmamembran vor, sondern pendelt als Homodimer zwischen Golgi-Apparat und Endoplasmatischem Retikulum (Hilairet *et al.*, 2001). Es kommt zu keiner Expression eines funktionellen CGRP-Rezeptors, ohne dass CRLR in äquimolaren Mengen vorliegt. Da die cAMP-Antwort in den Milzzellen von Mäusen mit RAMP-1 transduziertem Knochenmark erhöht war, könnte eine Kompetition von RAMP-1 und RAMP-2, 3 um CRLR bestehen. Dies könnte zu einer vermehrten Bildung von RAMP-1/CRLR-Heterodimeren und einer verminderten Assoziation von RAMP-2, 3/CRLR-Heterodimeren führen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sind möglicherweise durch eine reduzierte RAMP-2, 3-Rezeptorexpression beeinflusst.

Um diese Effekte mittels eines *in vivo*-Überexpressionssystems zu kontrollieren, wäre die Überexpression beider Rezeptorkomponenten wichtig. Durch die verstärkte Expression von RAMP-1/CRLR-Heterodimeren, würden deutlichere Effekte zu beobachten sein. So könnte möglicherweise eine Blockade der Granulopoese und damit eine Verminderung der myeloiden Lineage vermittelt über ein verstärktes CGRP Signalling gezeigt werden.

D.3 Mögliche Funktion des CGRP-Rezeptors in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark

Eine der Hauptursachen für die Mortalität vieler Tumorpatienten liegt nicht in der Ausbildung eines Primärtumors, sondern in dem Auftreten von Rezidiven, die häufig viele Jahre nach erfolgreicher Behandlung des Primärtumors auftreten. Es wird vermutet, dass dafür Tumorzellen verantwortlich sind, die in einem klinisch unauffälligen Patienten persistieren. Dieses Phänomen wird als *tumor dormancy* bezeichnet. Der Nachweis disseminierter Tumorzellen unterstützt die Vermutung, dass Tumorzellen im Körper latent überdauern können. Für die Persistenz von Tumorzellen im Knochenmark könnten Interaktionen zwischen den Tumorzellen und dem Stroma im Knochenmark eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die

Rolle von RAMP-1 in der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark anhand einer Lymphomzelllinie als Modell überprüft.

Die Lymphomzelllinien LCI und LCI sort. bilden nach subcutaner Injektion in DBA/2-Mäusen letale Primärtumore aus. Wurden allerdings die Lymphomzellen in ein Ohr der Experimentaltiere injiziert, so wurden keine Primärtumoren oder Metastasen detektiert. Jedoch wurden im Knochenmark der Mäuse disseminierte Tumorzellen gefunden. Diese im Knochenmark persistierenden Zellen, aus denen die Zelllinien KM1 und KM2 generiert wurden, lagen im Zustand der *tumor dormancy* vor (Müller *et al.*, 1998).

Die Lymphomzelllinien LCI und LCI sort. exprimieren im Gegensatz zu den KM-Varianten einen funktionellen Rezeptor für CGRP. In den KM-Zelllinien wurden nur die Rezeptorkomponenten RAMP-1 und CGRP-RCP detektiert, nicht hingegen CRLR. Dies könnte ein Hinweis auf eine unabhängige Regulation der Rezeptorkomponenten RAMP-1 und CGRP-RCP von CRLR sein.

Wie oben beschrieben hängt die Expression eines CGRP-Rezeptors von der gleichzeitigen Expression von CRLR und RAMP-1 ab. Das Vorliegen von RAMP-1 als stabiles Homodimer und die Lokalisierung im Golgi-Apparat würden es RAMP-1 ermöglichen, neben der Ausbildung des CGRP-Rezeptors andere Funktionen wahrzunehmen. Dies wird durch Ähnlichkeiten der RAMP-Proteine mit dem ERGIC-53 bestätigt.

ERGIC-53 ist ein Marker des *endoplasmatic reticulum-golgi-apparat intermediate compartment* (ERGIC), welcher Glykoproteine vom Endoplasmatischen Retikulum ins ERGIC transportiert. *In vitro* führt ein Fehlen von ERGIC-53 zu einem Defekt in der Sekretion von Glykoproteinen. RAMP-1 und ERGIC-53 sind beides Typ I Membranproteine, die als kovalent gebundene Homodimere vorliegen und für den Transport von Glykoproteinen verantwortlich sind (Hilairat *et al.*, 2001; Hauri *et al.*, 2000; McLatchie *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang könnte RAMP-1 eine regulatorische Funktion in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen und deren intrazellulärem Transport besitzen, die über die Regulation von CRLR hinausgeht.

Die Expression der CGRP-Rezeptorkomponente CGRP-RCP ist in den KM-Varianten unabhängig von RAMP-1 und CRLR. Dies korreliert mit der von CRLR und RAMP-1 unabhängigen Expression in humanen Granulozyten (vgl. Abschnitt D.1) und mit COS-7-Zellen, die zwar CGRP-RCP exprimieren, aber weder CRLR noch RAMP-1 (Evans *et al.*, 2000).

Da sich die Lymphomzelllinien KM und LCI in der Expression eines funktionellen CGRP-Rezeptors unterscheiden, könnte die Persistenz der KM-Varianten im Knochenmark in einer mangelnden CGRP- Signaltransduktion begründet sein.

Aktivierung von Zellen mit CGRP führt intrazellulär zu einer Erhöhung von cAMP-Spiegeln, vermittelt über G_s-Proteine, oder zu einer Erhöhung intrazellulärer Kalzium-Konzentrationen, vermittelt über G_q-Proteine und die Phospholipase C-β1 (PLC) (Wimalawansa *et al.*, 1997;

Drissi *et al.*, 1998). Die beiden *second messenger* cAMP und Kalzium vermitteln innerhalb der Zelle eine Vielzahl von Signalwegen.

cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die ihrerseits Serin- und Threonin-Reste von vielen Proteinen phosphoryliert und diese dadurch aktiviert bzw. inaktiviert. Unter diesen Proteinen sind Enzyme und Transkriptionsfaktoren.

Aktivierte PLC spaltet das Membranlipid Phosphatidyl-Inositol-bisphosphat in Inositol-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ öffnet Kalzium-Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums, so dass die Kalzium-Spiegel in der Zelle kurzzeitig angehoben werden und zur Aktivierung von Kalzium-bindenden Proteinen führen, die ihrerseits die Aktivität von Enzymen, Ionenpumpen und Zytoskelett-Komponenten steuern. DAG aktiviert die Proteinkinase C, die in Gegenwart von Kalzium Proteine phosphoryliert und so deren Aktivierungszustand ändert.

Es wäre denkbar, dass über das Fehlen einer CGRP vermittelten Signaltransduktion die Persistenz der KM-Varianten im Knochenmark im Vergleich zu den LCI-Varianten begünstigt wäre. Durch eine veränderte Expression von Adhäsionsmolekülen oder durch veränderte Adhäsionseigenschaften, vermittelt über die *second messenger* cAMP oder Kalzium, könnte die Auswanderung der KM-Zellen aus dem Knochenmark verhindert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Lymphomzelllinien sich in der Expression von Adhäsionsmolekülen unterscheiden. Die KM-Varianten zeichnen sich im Unterschied zu den LCI-Varianten durch das Fehlen von L-Selektin, einer verminderten Expression von ICAM-1 und einer verstärkten Expression des Integrins β_7 aus.

Ein Zusammenhang zwischen der CGRP vermittelten Signaltransduktion und der Expression von Adhäsionsmolekülen wurde in bronchialen Epithelzellen gezeigt. Über eine Aktivierung von NF- κ B erhöhte CGRP die ICAM-1-Expression (Tan *et al.*, 2003). Hiermit korreliert die im Vergleich zu den KM-Varianten erhöhte Expression von ICAM-1 in den LCI-Lymphomzellen, die einen funktionell aktiven CGRP-Rezeptor exprimieren.

E-Cadherin stellt den Liganden des Integrins $\alpha_5\beta_7$ dar, und spielt möglicherweise eine Rolle in der Persistenz der KM-Varianten im Knochenmark. Das auf Stromazellen exprimierte Adhäsionsmolekül E-Cadherin spielt eine zentrale Rolle in der Interaktion von hämatopoetischen Stammzellen mit Stromazellen des Knochenmarks und in der Regulation der Invasivität von Karzinomen.

In humanen Blasen-, Brust-, Lungen- und Pankreas-Karzinom-Zelllinien, die nicht metastasierten, war E-Cadherin exprimiert. Karzinom-Zelllinien dagegen, die kein E-Cadherin exprimierten, wiesen einen invasiven Phänotyp auf. Ihr Metastasierungsvermögen konnte allerdings durch Rekonstitution mit E-Cadherin aufgehoben werden (Frixen *et al.*, 1991). E-Cadherin vermittelte Signaltransduktion führte also möglicherweise zu einer verminderten Invasivität von Karzinomen, was sich auch in der verminderten Aggressivität der KM-Varianten widerspiegeln könnte. Vereinbar mit dieser Annahme ist, dass Tumorzellen im Status der

tumor dormancy durch einen nicht-aggressiven Zustand gekennzeichnet sind: Die Zellen weisen eine geringe Teilungsrate auf und sind nicht invasiv (Müller *et al.*, 1998; Khazaie *et al.*, 1994). Neben der möglichen Funktion von E-Cadherin in der Invasivität von Karzinomzellen, könnte auch ein Zusammenhang zwischen E-Cadherin und der Adhäsion von CD34⁺-Stammzellen an Stromazellen eine Rolle spielen.

Humane CD34⁺-Zellen, die mit E-Cadherin-Antikörpern inkubiert waren, adhärten im Vergleich zu unbehandelten CD34⁺-Zellen weniger stark an Stromazellen. Stromazellen, deren Differenzierung mit Zytokinangereichertem Medium induziert wurde, regulierten E-Cadherin ebenfalls herunter (Turel *et al.*, 1998). Die Herunterregulierung bzw. die Blockierung von E-Cadherin könnte zu einer verminderten Adhäsion von CD34⁺-Vorläuferzellen an Stromazellen führen. In Analogie zu den CD34⁺-Zellen könnte die Persistenz der KM-Lymphomzellen im Knochenmark durch Adhäsion an Stromazellen vermittelt über E-Cadherin entstehen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Neuropeptidrezeptorexpression und -responsivität mit der Persistenz von Lymphomzellen im Knochenmark korreliert. Desweiteren wurde die Bedeutung neuronaler Impulse im Knochenmark, die über CGRP vermittelt werden, untermauert.

D.4 Die Bedeutung von CGRP bei der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen

Antigenpräsentierende Zellen sind wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems. Anatomisch wurde ein enger Kontakt zwischen Antigenpräsentierenden Zellen der Haut, den Langerhans Zellen, und Nervenfasern mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie dargestellt (Hosoi *et al.*, 1993). Auch funktionelle Interaktionen wurden zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und dem Neuropeptid CGRP gezeigt. CGRP weist immunsuppressive Eigenschaften auf, indem es zu einer verminderten Antigenpräsentation in Makrophagen und Dendritischen Zellen führt (Hosoi *et al.*, 1993, Asahina *et al.*, 1995; Carucci *et al.*, 2000).

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass die CGRP-Rezeptor-Komponenten auf myeloiden und plasmazytoiden Dendritischen Zellen sowie auf Thioglykollat-induzierten Peritonealmakrophagen exprimiert werden und dass der Rezeptor funktionell aktiv ist, was zur Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel nach Aktivierung mit CGRP führt. Die Modulation der Immunfunktion von Antigenpräsentierenden Zellen wurde durch den direkten Einfluss von CGRP untersucht. Dazu wurden sie mit TLR-Agonisten aktiviert und anhand der Zytokin- und Chemokinproduktion wurde die schnelle Immunantwort untersucht. Die Produktion des Zytokins TNF- α wird in CpG 2216 aktivierten myeloiden DCs und Thioglykollat-induzierten Peritonealmakrophagen nach CGRP-Stimulation signifikant supprimiert. Kontrollexperimente mit dem CGRP-Rezeptor-antagonisten CGRP₈₋₃₇ zeigen, dass dieser Effekt spezifisch ist. Die Bedeutung des suppressiven

Effekts von CGRP wird durch den Befund verstärkt, dass myeloide DCs und Thioglykollat-induzierte Peritonealmakrophagen auch nach Aktivierung mit Agonisten der TLRs 2, 3 und 4 die TNF- α -Produktion signifikant vermindern.

Der Effekt von CGRP auf die Immunfunktion Antigenpräsentierender Zellen wurde auch für das Zytokin IL-10 und die Chemokine MCP-1/JE und KC untersucht.

Obwohl für die antiinflammatorischen Neuropeptide VIP und *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) gezeigt wurde, dass sie in murinen LPS-aktivierten Mikrogliazellen, die Antigenpräsentierenden Zellen des ZNS entsprechen, die Expression der Chemokine KC und MCP-1/JE supprimieren (Delgado *et al.*, 2002), konnte dies in myeloiden DC und Makrophagen nicht bestätigt werden. In mit TLR-Agonisten aktivierten myeloiden DC sowie Thioglykollat-Makrophagen wurde die IL-10- und KC-Produktion durch CGRP nicht reguliert. Es wurde auch keine Korrelation zwischen der IL-10 und TNF- α - bzw. KC-Produktion beobachtet. Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 reguliert in Makrophagen sowohl die Produktion von TNF- α als auch die von KC herunter (Hamilton *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001). Auf diese Weise wird möglicherweise eine überschießende Reaktion des Immunsystems während einer Infektion verhindert. Obwohl für CGRP gezeigt wurde, dass es in humanen Dendritischen Zellen IL-10 hochreguliert (Carucci *et al.*, 2000) konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise wird im Zusammenspiel von CGRP mit der Aktivierung von TLRs die Hochregulation von IL-10 blockiert, da CGRP TNF- α direkt herunterreguliert und so einer systemischen Entzündungsreaktion entgegen wirkt. Desweiteren könnte CGRP die Zytokin- und Chemokinexpression abhängig vom Zelltyp und Ursprung unterschiedlich regulieren.

In Makrophagen und Dendritischen Zellen werden Zytokine differenziell reguliert. So wird in dieser Arbeit die P3C-induzierte Sekretion von MCP-1/JE in Thioglykollat-induzierten Makrophagen beobachtet, in myeloiden DC dagegen nicht. Häcker *et al.* (1999) zeigten bereits, dass nach Aktivierung mit CpG-DNA in Makrophagen die MAPK ERK 1,2 aktiviert wird, wodurch TNF- α verstärkt und IL-12 vermindert synthetisiert wird. In DC dagegen aktiviert CpG-DNA die MAPK ERK 1,2 nicht und die Produktion von IL-12 wird dadurch auch nicht verringert.

Für Makrophagen wurde gezeigt, dass Stimulation von TLRs mit verschiedenen Liganden zur Aktivierung unterschiedlicher Zytokine und Chemokine führt. Die TLRs detektieren über ihre extrazelluläre Domäne Unterschiede in mikrobiellen Strukturen und initiieren intrazellulär unterschiedliche Signaltransduktionswege über Interaktion der intrazellulären Domäne mit verschiedenen Adaptormolekülen. Es wird über die TLRs also nicht generell nur ein Signaltransduktionsweg eingeschaltet, sondern es werden abhängig von dem aktivierten TLR unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert, deren zentraler Adapter MyD88 ist. Daneben gibt es einen MyD88-unabhängigen Weg, der über Aktivierung der TLR3 und 4 und den Adaptoren TRIF/TRAM zur Sekretion von IFN- β führt. Aktivierung von Makrophagen mit LPS (TLR4-Ligand) führte zur Phosphorylierung des Tyrosins 701 von STAT1- α und - β . Stimulation mit LPS und einem blockierenden IFN- β -Antikörper dagegen führte zu keiner Aktivierung der STAT1-

Proteine. In analogen Experimenten, in denen die Makrophagen mit P3C (TLR2-Ligand) aktiviert wurden, konnten weder STAT-Proteine aktiviert noch IFN- β induziert werden (Toshchakov *et al.*, 2002). Das Signalling über TLR2 ist also ausschließlich MyD88-abhängig. Diese Ergebnisse zeigen, dass TLR2- und TLR4-Agonisten die Expression unterschiedlicher Gene induzieren und dabei auch unterschiedliche Signaltransduktionswege anschalten.

Diese Daten korrelieren mit Befunden dieser Arbeit, in denen gezeigt wurde, dass das Chemokin MCP-1/JE in myeloiden DC durch LPS induziert wurde, durch P3C jedoch nicht und vertieft das Verständnis für die Koexistenz von verschiedenen Signalwegen, die abhängig vom aktivierten TLR angeschaltet werden. CGRP hatte keinen Effekt auf die Produktion von MCP-1/JE in den myeloiden DC und Thioglykollat-induzierten Makrophagen.

Diese Daten zeigen, dass ausschließlich das Zytokin TNF- α in DC und Thioglykollat-induzierten Makrophagen durch CGRP spezifisch supprimiert wird. Das Zytokin IL-10 und die Chemokine MCP-1/JE und KC jedoch werden durch CGRP nicht reguliert. CGRP unterdrückt selektiv die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , wobei die Signalwege des G-Protein gekoppelten 7-Helix-Rezeptors und des TLR9-Rezeptors interagieren.

Neuere Studien heben die Bedeutung von Rezeptorinteraktionen hervor. Besonders im Kontext der angeborenen Immunität ist es wahrscheinlich, dass eindringende Pathogene ein Netzwerk von Signalwegen aktivieren und so eine auf das Pathogen zugeschnittene Immunantwort induzieren, die in ihrer Intensität und Dauer an die jeweilige Entzündungssituation angepasst ist (Underhill *et al.*, 2003). Jedes Pathogen besitzt zahlreiche PAMPs, die Liganden unterschiedlicher TLRs sind. So können Gram-negative Bakterien beispielsweise über Lipopeptide, LPS, CpG-DNA und Flagellin von den TLRs 2/1 bzw. 2/6, 4, 9 und 5 erkannt werden. Die Redundanz in der Erkennung von Pathogenen stellt für das angeborene Immunsystem einen zusätzlichen Schutzmechanismus gegen eindringende Mikroorganismen dar.

Neben den TLRs erkennen auch eine Reihe anderer Rezeptoren eindringende Pathogene. CD14, Dectin-1 oder DC-SIGN können alleine oder im Zusammenspiel mit anderen Rezeptoren Immunantworten hervorrufen bzw. modulieren. Wird also ein eindringendes Pathogen von einer Kombination von Rezeptoren erkannt, so ist die immunologische Reaktion eine Summe der Interaktionen der Rezeptoren. Die Redundanz in den Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems ist sehr wichtig, denn so wird eine Umgehung der Abwehrmechanismen des Körpers erschwert.

TLR4 ist der am Besten untersuchte Rezeptor der TLR-Familie. Es wurde gezeigt, dass TLR4 mit MD2 und CD14 assoziiert. Es gibt Hinweise, dass die Interaktion mit weiteren Membranproteinen in *Lipid Rafts* das Binden von LPS und die LPS-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst. Dabei werden Mac-1, *heat shock* Proteine (Hsp) 70 und 90 sowie *growth differentiation factor* (GDF) 5 diskutiert (Pfeiffer *et al.*, 2001; Triantafilou *et al.*, 2002; Triantafilou *et al.*, 2001).

Dectin-1 ist ein C-Typ Lektin, das an der Erkennung von Hefen während der angeborenen Immunantwort beteiligt ist. Neuere Studien haben gezeigt, dass Dectin-1 mit TLR2 und TLR6 bei der Erkennung von Zellwandbestandteilen kooperiert. TLR2—TLR6 Heterodimere aktivieren NF- κ B, während Dectin-1 β -Glukane der Zellwand detektiert und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies stimuliert (Brown *et al.*, 2001; Gantner *et al.*, 2003; Ozinsky *et al.*, 2000).

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen funktionellen Interaktionen von TLRs mit dem CGRP-Rezeptor unterstützen das Konzept der Rezeptorinteraktionen, um eine Feinabstimmung der Immunantwort zu erreichen.

Die Bedeutung neuro-immunologischer Kommunikationen wurde in unterschiedlichen Studien belegt. *In vitro* wurde die neuronale Kontrolle systemischer Entzündungsreaktionen in LPS aktivierten humanen Makrophagen gezeigt. Wurden sie mit Acetylcholin, dem wichtigsten Transmitter des Nervus vagus, stimuliert, war ihre TNF- α -Sekretion vermindert, die des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 jedoch nicht. *In vivo* konnte dieser Befund an Ratten bestätigt werden. Elektrische Stimulation des Nervus vagus inhibierte die letale Wirkung von LPS, indem die TNF- α Synthese in der Leber und die TNF- α -Serumkonzentrationen vermindert waren. Vagotomie jedoch verstärkte die TNF- α -Antwort nach inflammatorischen Stimuli und erhöhte so die Letalität der Experimentaltiere (Borovikova *et al.*, 2000).

Für LPS-aktivierte Peritonealmakrophagen wurde gezeigt, dass die TNF- α - und die IL-12p40 Produktion cAMP-abhängig supprimiert wird (Feng *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde eindeutig der suppressive Effekt von CGRP auf die Immunfunktion von myeloiden DC und Thioglykollat-induzierten Makrophagen gezeigt.

In mit TLR-Agonisten aktivierten myeloiden DC und Thioglykollat-induzierten Makrophagen wurde die TNF- α -Produktion durch CGRP spezifisch und signifikant vermindert. Deshalb wurde das Signalling, über das die TNF- α -Produktion reguliert wird genauer untersucht. So wurde gezeigt, dass die verminderte Proteinsynthese nicht in einer verminderten Transkription begründet war, denn CpG-DNA und CpG-DNA / CGRP stimulierte myeloide DC wiesen die gleichen TNF- α -mRNA-Mengen auf. Analyse der I κ B- α -Degradierung zeigte keine Unterschiede zwischen CpG-DNA und CpG-DNA / CGRP stimulierten myeloiden DC.

Im Zytoplasma liegt der Transkriptionsfaktor NF- κ B als Komplex mit I κ B- α vor. Degradierung von I κ B- α führt zur Aktivierung und anschließenden Translokation von NF- κ B in den Nukleus. Dort induziert NF- κ B beispielsweise die Transkription des *tnf- α* -Gens.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die CGRP-vermittelte Hemmung der TNF- α -Produktion in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC nicht auf der Ebene der Transkription erfolgt. I κ B- α wird in CpG-DNA aktivierten Zellen im normalen Maße degradiert. Stimulation mit CGRP inhibiert die I κ B- α -Degradierung nicht, so dass *tnf- α* transkribiert werden kann. Die Degradierung von I κ B- α korreliert mit dem Befund der quantitativen PCR, in der gezeigt wurde,

dass myeloide DC, die sowohl mit CpG-DNA als auch CpG-DNA / CGRP stimuliert wurden, die gleichen TNF- α -mRNA-Konzentrationen aufwiesen.

Da CpG-DNA aktivierte myeloide DC nach CGRP-Stimulation zwar signifikant weniger TNF- α -Protein produzieren, aber die gleichen Level der TNF- α -mRNA aufweisen, könnte die Modulation der TNF- α -Produktion auf Translationsebene stattfinden.

Die Translationskontrolle von *tnf- α* erfolgt über einen komplexen Mechanismus, der über MAP Kinasen vermittelt wird und dabei über RNA-bindende Proteine, wie TIA-1, die Stabilität und Translation des TNF- α -Transkriptes reguliert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CpG-DNA aktivierte myeloide DC die MAP Kinase p38 aktivieren. Zusätzliche Stimulation mit CGRP verminderte die Phosphorylierung von p38. Mit diesen Daten korrelieren Befunde von Häcker *et al.* (1998) in denen murine Makrophagen und Dendritische Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA die MAPK JNK1 und p38 aktivieren und TNF- α und IL-12 sezernieren. Zusammen mit Daten dieser Arbeit, könnten die Befunde darauf hinweisen, dass über eine verminderte Aktivierung von p38 die TNF- α -Produktion supprimiert wird.

Die Regulation von mRNA-Stabilität und Translation ist ein wichtiger Faktor in der Modulation der Expression von Genen - insbesondere solcher Gene, die nur während eines definierten Zeitfensters exprimiert werden sollen, wie beispielsweise Zytokine. In diesem Zusammenhang spielen Adenylat/Uridylat-rich-elements (ARE) im 3'UTR eine wichtige Rolle (Chen *et al.*, 1995). Die stabilisierenden und destabilisierenden Aktivitäten von ARE-bindenden Proteinen werden über ein Netzwerk von Signalkaskaden reguliert, um die Zelle an extra- und intrazelluläre Signale anzupassen.

Für die p38 MAPK wurde gezeigt, dass sie in die Regulation der Halbwertszeit von TNF- α -mRNA involviert ist (Brook *et al.*, 2000). Mäuse, die ARE-defiziente mRNAs transkribierten, wiesen Defekte in der TNF- α -mRNA Destabilisierung sowie der Translationsrepression auf. Des weiteren konnte die Translation ARE-defizienter mRNAs nicht mehr über die MAPK p38 und JNK moduliert werden.

Diese Daten korrelieren mit dem Ergebnis, dass die Suppression der TNF- α -Produktion über die p38 MAPK auf Ebene der Translation reguliert wird.

Die MAPK p38 phosphoryliert direkt die MAPKAP Kinase 2 (MK2). Die Bedeutung von MK2 für die TNF- α -Synthese wurde in MK2-defizienten Mäusen beobachtet. Ihr Überleben in einem LPS-Schockmodell war verlängert, da die TNF- α -Produktion um 90% vermindert war. Wurden zusätzlich die ARE des TNF- α -Gens deletiert, war die TNF- α -Biosynthese wieder hergestellt (Kotlyarov *et al.*, 1999; Neining *et al.*, 2002). MK2 interagiert mit TIA-1, einem RNA-bindenden Protein, das an ARE des 3'UTR von mRNA bindet. Eine mögliche Signaltransduktion von p38 über MK2 zu TIA-1 in der Regulation der Translation von TNF- α -Transkripten wird in TIA-1-defizienten Makrophagen bestätigt. Diese exprimieren nach LPS-Stimulation signifikant

mehr TNF- α als Wildtyp-Makrophagen, da TIA-1 als *translational silencer* agiert. Das Fehlen von TIA-1 verstärkt die Assoziation von TNF- α -mRNA mit Polysomen und damit die Translation der TNF- α -Transkripte (Piecyk *et al.*, 2000).

Das Neuropeptid CGRP könnte also über eine verminderte Phosphorylierung der MAPK p38 in CpG-DNA-aktivierten myeloiden DC die Interaktion der TNF- α -Transkripte mit Polysomen verringern, indem die Kinase MK2 nicht aktiviert wird und die Bindung von TIA-1 an ARE der TNF- α -mRNA bestehen bliebe. Über diesen Weg könnte die verminderte TNF- α -Produktion erklärt werden.

CGRP supprimiert die TNF- α -Produktion über eine verminderte Aktivierung der MAP Kinase p38 in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC. In der Folge wird wahrscheinlich die Translation von TNF- α -Transkripten verringert und somit weniger TNF- α produziert. Die verminderte TNF- α -Produktion bestätigt sowohl die Assoziation des Nervensystems mit dem Immunsystem, als auch die immunsuppressiven Effekte von CGRP. Desweiteren wird die komplexe Signaltransduktion der TLRs über die Adaptormoleküle MyD88 und TRIF hervorgehoben und auch die Rolle von CGRP in der Interaktion mit den TLRs gestärkt.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen CGRP und der MAPK p38 in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC gezeigt. Die Stimulation von TLRs kann sowohl MyD88-abhängige als auch MyD88-unabhängige Signalwege, die über TRIF laufen, anschalten. Der Adaptor TRIF ist in TLR3 und TLR4 abhängige Signalwege integriert, während CpG-DNA (TLR9) nur über den Adaptor MyD88 Signale vermittelt. Analyse der MAPK p38 in LPS-aktivierten (TLR4) myeloiden DC würde Aufschluss darüber geben, ob die verminderte TNF- α -Produktion über den gleichen Mechanismus wie in CpG-DNA aktivierten myeloiden DC reguliert wird.

Auf posttranskriptioneller Ebene reguliert die MAP Kinase ERK 1,2 die Proteinbiosynthese von TNF- α . Dabei steuern Tpl2/ERK-Signale über die Translokation der TNF- α -mRNA vom Nukleus in das Zytoplasma die Translation von TNF- α (Dumitru *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CGRP die MAP Kinase ERK 1,2 in CpG-DNA-aktivierten myeloiden DC nicht moduliert, so dass die Expression von TNF- α wahrscheinlich nicht über ERK 1,2 sondern über die p38 reguliert wird.

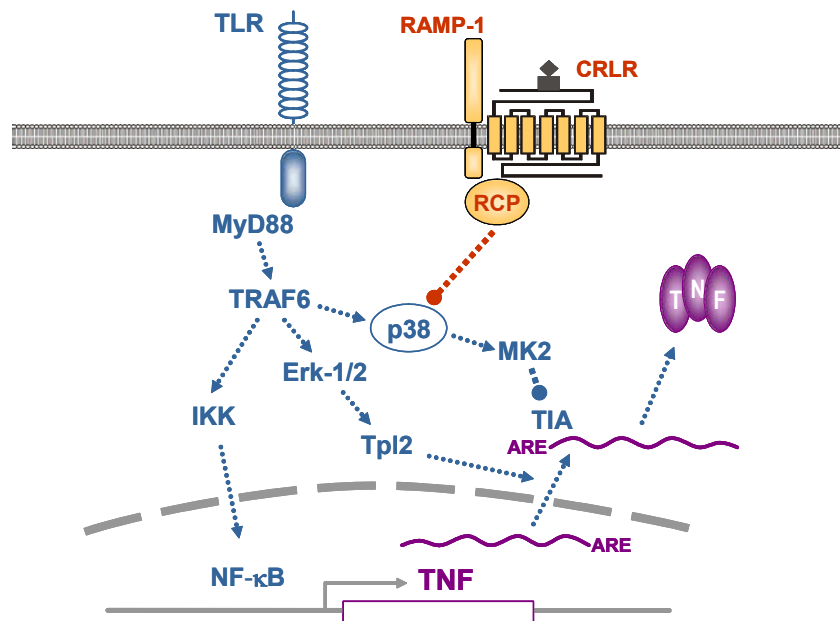


Abbildung 42: Mögliche Interaktion des CGRP-Rezeptors mit Toll-like Rezeptoren bei der Regulation der TNF- α -Expression

Bindung von CGRP an seinen Rezeptor führt über $G_{\alpha s}$ -Proteine und cAMP zur Aktivierung der Protein Kinase A (PKA). Alternativ wird über $G_{\alpha q/11}$ -Proteine die Protein Kinase C (PKC) aktiviert (Wimalawansa *et al.*, 1997, Drissi *et al.*, 1998). Für beide Kinasen wurde gezeigt, dass sie über GTPasen und MAPKKK abhängig vom Experimentalansatz ERK 1,2 sowohl aktivieren als auch deaktivieren können (Kolch *et al.*, 1993; Stork *et al.*, 2002). Obwohl ein Zusammenhang zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und der Modulation von ERK 1,2 gezeigt wurde, gibt es bisher keine Daten über einen Zusammenhang mit der MAPK p38. Diese Arbeit weist nun erstmals auf eine mögliche Regulation der MAP Kinase p38 durch Signale, vermittelt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, hin.

In T-Zellen wurde gezeigt, dass $I\kappa B$ - α -Degradierung von PKA abhängig ist. Die $I\kappa B$ - α -Degradierung aktivierter DC könnte also über die PKA vermittelt werden (Torgersen *et al.*, 2002).

Ein interessanter Aspekt weitere Experimente ist die Frage, ob die MAPK p38 über die PKA oder PKC reguliert wird.

Neben den myeloiden DC wurden auch der Einfluss des Neuropeptids CGRP auf die Zytokinproduktion CpG-DNA-aktivierter plasmazytoider DC untersucht.

In der Maus sind bisher drei verschiedene DC-Subsets in der Milz beschrieben, in den Lymphknoten sind es sogar fünf (Henri *et al.*, 2001). Dennoch stammen alle Subsets von einer gemeinsamen Vorläuferzelle ab (Del Hoyo *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den phänotypischen Charakterisierungen der DC sind die funktionellen Charakteristika der einzelnen Subsets weitgehend unbekannt. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass plasmazytoide DC nach Stimulation mit CpG-DNA IFN- α produzieren, dies aber durch CGRP nicht moduliert wird. CpG-

DNA induziert auch die Sekretion von TNF- α , jedoch sind die Mengen des produzierten Zytokins wesentlich geringer als in myeloiden DC und die TNF- α -Produktion lässt sich auch nicht durch CGRP supprimieren.

Plasmazytoide DC unterscheiden sich von den myeloiden DC durch die Expression von Oberflächenmolekülen, in der Sekretion von Zytokinen, der Aktivierung einer T-Zell-Antwort und der Verteilung lymphoider Gewebe. So exprimieren die plasmazytoiden DC nicht die TLRs 2, 3 und 4 und produzieren nach viraler Stimulation große Mengen an Typ I Interferonen.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse unterstreichen die unterschiedlichen Funktionen von plasmazytoiden und myeloiden DC und zeigen eine differentielle Regulation der neurologischen Kontrolle von Dendritischen Zellen.

E: Zusammenfassung und Ausblick

Das Neuropeptid CGRP und dessen Rezeptor spielen eine wichtige Rolle in den unterschiedlichsten physiologischen Vorgängen des Körpers. So ist CGRP ein wichtiges vasoaktives Peptid, es ist in den Verlauf der Sepsis involviert, an neuro-immunologischen Kommunikationen beteiligt und es moduliert das Microenvironment im Knochenmark.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der CGRP-Rezeptor in der humanen Myelopoese differenziell reguliert wird. CD34⁺-Progenitorzellen des Knochenmarks exprimieren die Rezeptorkomponenten RAMP-1, CRLR sowie CGRP-RCP. Die Aktivierung des Rezeptors mit CGRP resultiert in einer Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel, so dass CD34⁺-Progenitorzellen einen funktionell aktiven CGRP-Rezeptor aufweisen. Reife Granulozyten dagegen exprimieren keinen funktionellen CGRP-Rezeptor. *In vitro* differenzierte CD34⁺-Progenitorzellen regulieren während der durch SCF und G-CSF induzierten Granulopoese den CGRP-Rezeptor herunter. Vermittelt über den CGRP-Rezeptor fördert das Neuropeptid CGRP direkt die Granulopoese humaner CD34⁺-Progenitorzellen *in vitro*.

Durch Überexpression der CGRP-Rezeptorkomponente RAMP-1 in murinen Knochenmarkszellen mittels retroviralen Gentransfer wurde die Bedeutung des Rezeptors in der Hämatopoese *in vivo* untersucht. Eine Überexpression von RAMP-1 beeinflusst nicht die Rekonstitution und Entwicklung myeloider, B- und T-Zell-Lineages. Da die Expression des CGRP-Rezeptorkomplexes abhängig ist von der Koexpression von RAMP-1 und CRLR, würde die gleichzeitige Überexpression beider Rezeptorkomponenten in murinen Knochenmarkszellen helfen, die Bedeutung des Rezeptors in der Granulopoese weiter aufzuklären.

Interaktionen von Tumorzellen mit Stromazellen im Knochenmark könnten für das Persistieren disseminierter Tumorzellen im Knochenmark verantwortlich sein. Anhand der Modellzelllinien LCI und KM wurde diese Hypothese untersucht. Die Lymphomzelllinie LCI verursacht nach geeigneter Applikation in Mäusen eine Tumorpersistenz im Knochenmark. Aus diesen Zellen wurde die KM-Variante der LCI Lymphomzelllinie generiert. Die LCI-Lymphomzellen unterscheiden sich von den KM-Varianten durch die Expression der Rezeptorkomponente CRLR und somit durch die Expression eines funktionellen CGRP-Rezeptors. Mögliche Interaktionen mit Stromazellen des Knochenmarks wurden über Analyse von Adhäsionsmolekülen durchgeführt. Die im Knochenmark persistierenden KM-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den LCI-Varianten das Integrin $\beta 7$ und weisen keine Expression von L-Selektin auf. Bindungsstudien der Lymphomzellen an Stromazellen des Knochenmarks könnten weiteren Aufschluss über die Interaktionen geben und das Überdauern disseminierter Tumorzellen im Knochenmark beleuchten.

Über den Einfluss von CGRP auf aktivierte Antigenpräsentierende Zellen wurde das Verständnis für das Zusammenspiel von Nerven- und Immunsystem vertieft. Knochenmark abgeleitete myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen, sowie Thio glykollat-induzierte Makrophagen exprimieren einen funktionellen CGRP-Rezeptor. Mit TLR-Agonisten aktivierte

Antigenpräsentierende Zellen induzieren die Zytokine IL-10 und TNF- α und die Chemokine KC sowie teilweise MCP-1. Zusätzliche Stimulation mit CGRP supprimiert die Produktion von TNF- α . Die verminderte Expression von TNF- α wird nicht auf Transkriptionsebene, sondern auf Translationsebene reguliert. Die MAP Kinase p38 wird in CpG / CGRP stimulierten myeloiden DC weniger aktiviert als in CpG stimulierten myeloiden DC. Über p38 wird das RNA-bindende Protein TIA-1 reguliert, das als *translational silencer* die Expression von TNF- α vermindert. CGRP könnte über eine verminderte Aktivierung von p38 die Bindung von TIA-1 an das TNF- α -Transkript stabilisieren und so die Expression verringern. Es bleibt zu zeigen, über welche *second messenger* das extrazelluläre CGRP-Signal intrazellulär in eine p38-Hemmung umgesetzt wird. Da CGRP über G_{as} intrazelluläre cAMP- und über G_{oq/11} intrazelluläre Kalziumspiegel erhöht sowie die PKC aktiviert, wären dies potentielle Mechanismen.

F: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Adenylat/Uridylat-rich elements
bp	Basenpaar
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid
BFU-E	erythroide Kolonien
BSA	bovines Serumalbumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CATS	cell adhesion regulating protein for tissue stroma-1
CD	cluster of differentiation
cDNS	complementary DNS
CFU-GM	granulo-monozytische Kolonien
CFU-Mix	gemischte Kolonien
CGRP	calcitonin gene related peptide
CGRP-RCP	CGRP-receptor component protein
CRLR	calcitonin receptor like receptor
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DC	Dendritische Zellen
dCTP	Desoxycytidin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanidin-Triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DTH	delayed type hypersensitivity
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dNTP	Mischung aller vier Desoxynukleosid-Triphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoitin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERK1,2	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorter)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FLT3L	Flt3-Ligand
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescence protein
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase
h	human
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B-kinase
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
IRAK	IL-1R associated protein kinase
k	kilo
kDa	Kilodalton
LRR	leucin-rich repeats
μ	mikro
M	molar
m	murin
m	milli
mA	Milliampère
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MK2	MAPKAP-2
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MHC	major histocompatibility complex

MIP1 α	macrophage inflammatory protein
n	nano
NF- κ B	nuclear factor κ B
OD	optische Dichte
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam-3-Cys	Pyridin-2-Aldoxin-Methiodid-3-Cystein
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
pIC	Polyinosinic-Polycytidylic Acid
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
RAMP	receptor activity modifying protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut Medium
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschliessender PCR
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
STAT	signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK-1-binding protein
TAK	TGF- β -activated kinase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN- β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TLR	Toll-like Rezeptoren
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRIF	Toll-IL-1 receptor domaine containing adaptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u	unit (Einheit)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute

UTR	untranslated region
V	Volt
VIP	vasoactive intestinal peptide

G: Literaturverzeichnis

Afan AM, Broome CS, Nicholls SE, Whetton AD, and Miyan JA: Bone marrow innervation regulates cellular retention in the murine haemopoietic system. *Br.J.Haematol.* 98 (1997) 569-577

Aiyar N, Rand K, Elshourbagy NA, Zeng Z, Adamou JE, Bergsma DJ, and Li Y: A cDNA encoding the calcitonin gene-related peptide type 1 receptor. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 11325-11329

Aiyar N, Disa J, Dang K, Pronin AN, Benovic JL, and Nambi P: Involvement of G protein-coupled receptor kinase-6 in desensitization of CGRP receptors. *Eur.J.Pharmacol.* 403 (2000) 1-7

Akira S: Toll-like receptor signaling. *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 38105-38108

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, and Evans RM: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298 (1982) 240-244

Asahina A, Hosoi J, Beissert S, Stratigos A, and Granstein RD: Inhibition of the induction of delayed-type and contact hypersensitivity by calcitonin gene-related peptide. *J.Immunol.* 154 (1995) 3056-3061

Asahina A, Moro O, Hosoi J, Lerner EA, Xu S, Takashima A, and Granstein RD: Specific induction of cAMP in Langerhans cells by calcitonin gene-related peptide: relevance to functional effects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92 (1995) 8323-8327

Asahina A, Hosoi J, Murphy GF, and Granstein RD: Calcitonin gene-related peptide modulates Langerhans cell antigen-presenting function. *Proc.Assoc.Am.Physicians* 107 (1995) 242-244

Beer S, Weighardt H, Emmanuilidis K, Harzenetter MD, Matevossian E, Heidecke CD, Bartels H, Siewert JR, and Holzmann B: Systemic neuropeptide levels as predictive indicators for lethal outcome in patients with postoperative sepsis. *Crit Care Med.* 30 (2002) 1794-1798

- Belz GT, Heath WR, and Carbone FR: The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol.Cell Biol.* 80 (2002) 463-468
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, and Tracey KJ: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405 (2000) 458-462
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, and MacIntyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313 (1985) 54-56
- Brook M, Sully G, Clark AR, and Saklatvala J: Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. *FEBS Lett.* 483 (2000) 57-61
- Broome CS, Whetton AD, and Miyan JA: Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production is mediated by both direct and indirect effects on CFU-GM. *Br.J.Haematol.* 108 (2000) 140-150
- Brown GD and Gordon S: Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413 (2001) 36-37
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, and Goeddel DV: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383 (1996) 443-446
- Cao Z, Henzel WJ, and Gao X: IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271 (1996) 1128-1131
- Carucci JA, Ignatius R, Wei Y, Cypess AM, Schaer DA, Pope M, Steinman RM, and Mojsos S: Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J.Immunol.* 164 (2000) 3494-3499
- Chen CY and Shyu AB: AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation . *Trends Biochem.Sci.* 20 (1995) 465-470

- Chiba T, Yamaguchi A, Yamatani T, Nakamura A, Morishita T, Inui T, Fukase M, Noda T, and Fujita T: Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am.J.Physiol* 256 (1989) E331-E335
- del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, and Ardavin C: Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415 (2002) 1043-1047
- Delgado M, Jonakait GM, and Ganea D: Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit chemokine production in activated microglia. *Glia* 39 (2002) 148-161
- Dennis T, Fournier A, Guard S, St Pierre S, and Quirion R: Calcitonin gene-related peptide (hCGRP alpha) binding sites in the nucleus accumbens. Atypical structural requirements and marked phylogenic differences. *Brain Res.* 539 (1991) 59-66
- Drissi H, Lasmoles F, Le M, V, Marie PJ, and Lieberherr M: Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 20168-20174
- Dumitru CD, Ceci JD, Tsatsanis C, Kontoyiannis D, Stamatakis K, Lin JH, Patriotis C, Jenkins NA, Copeland NG, Kollias G, and Tsichlis PN: TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103 (2000) 1071-1083
- Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, and Wiedermann CJ: Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 166 (2001) 2167-2172
- Edvinsson L: New therapeutic target in primary headaches - blocking theCGRP receptor. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 7 (2003) 377-383
- Evans BN, Rosenblatt MI, Mnayer LO, Oliver KR, and Dickerson IM: CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 31438-31443

- Fearon DT: Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388 (1997) 323-324
- Feng Y, Tang Y, Guo J, and Wang X: Inhibition of LPS-induced TNF- α production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sci.* 61 (1997) L-7
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, and Maniatis T: IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat.Immunol.* 4 (2003) 491-496
- Fluhmann B, Muff R, Hunziker W, Fischer JA, and Born W: A human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 206 (1995) 341-347
- Fox FE, Kubin M, Cassin M, Niu Z, Hosoi J, Torii H, Granstein RD, Trinchieri G, and Rook AH: Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J.Invest Dermatol.* 108 (1997) 43-48
- Fraser NJ, Wise A, Brown J, McLatchie LM, Main MJ, and Foord SM: The amino terminus of receptor activity modifying proteins is a critical determinant of glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor. *Mol.Pharmacol.* 55 (1999) 1054-1059
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, and Birchmeier W: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J.Cell Biol.* 113 (1991) 173-185
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, and Underhill DM: Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J.Exp.Med.* 197 (2003) 1107-1117
- Goadsby PJ and Edvinsson L: The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann.Neurol.* 33 (1993) 48-56

Goetzl EJ, Voice JK, Shen S, Dorsam G, Kong Y, West KM, Morrison CF, and Harmar AJ: Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 98 (2001) 13854-13859

Goodman EC and Iversen LL: Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide. Life Sci. 38 (1986) 2169-2178

Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Grignani F, Lanfranccone L, Peschle C, Nolan GP, and Pelicci PG: High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. Cancer Res. 58 (1998) 14-19

Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, and Wagner H: CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. EMBO J. 17 (1998) 6230-6240

Hacker H, Mischak H, Hacker G, Eser S, Prenzel N, Ullrich A, and Wagner H: Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. EMBO J. 18 (1999) 6973-6982

Hamilton TA, Ohmori Y, and Tebo J: Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines. Immunol.Res. 25 (2002) 229-245

Hauri HP, Kappeler F, Andersson H, and Appenzeller C: ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. J.Cell Sci. 113 (Pt 4) (2000) 587-596

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, and Shortman K: The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. J.Immunol. 167 (2001) 741-748

- Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, and Abraham D: Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J.Immunol.* 165 (2000) 4544-4551
- Higuchi R, Krummel B, and Saiki RK: A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 7351-7367
- Hilairt S, Belanger C, Bertrand J, Laperriere A, Foord SM, and Bouvier M: Agonist-promoted internalization of a ternary complex between calcitonin receptor-like receptor, receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and beta-arrestin. *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 42182-42190
- Hilairt S, Foord SM, Marshall FH, and Bouvier M: Protein-protein interaction and not glycosylation determines the binding selectivity of heterodimers between the calcitonin receptor-like receptor and the receptor activity-modifying proteins. *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 29575-29581
- Hochrein H, O'Keeffe M, and Wagner H: Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum.Immunol.* 63 (2002) 1103-1110
- Holzmann B, Weighardt H, and Heidecke CD: [Receptors and signal proteins of the innate immune system as new targets in sepsis therapy. Reprogramming of the immune response]. *Chirurg* 74 (2003) 61-64
- Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, and Granstein RD: Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363 (1993) 159-163
- Iversen PO, Hjeltne N, Holm B, Flatebo T, Strom-Gundersen I, Ronning W, Stanghelle J, and Benestad HB: Depressed immunity and impaired proliferation of hematopoietic progenitor cells in patients with complete spinal cord injury. *Blood* 96 (2000) 2081-2083

- Janeway CA, Jr.: A trip through my life with an immunological theme. *Annu.Rev.Immunol.* 20 (2002) 1-28
- Janssens S and Beyaert R: A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem.Sci.* 27 (2002) 474-482
- Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, and Li X: Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol.Cell Biol.* 22 (2002) 7158-7167
- Jiang Z, Johnson HJ, Nie H, Qin J, Bird TA , and Li X: Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J.Biol.Chem.* 278 (2003) 10952-10956
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, and Akira S: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes . *J.Immunol.* 167 (2001) 5887-5894
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, and Akira S: Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes . *J.Immunol.* 167 (2001) 5887-5894
- Kawamura N, Tamura H, Obana S, Wenner M, Ishikawa T, Nakata A, and Yamamoto H: Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets. *Neuroimmunomodulation.* 5 (1998) 9-15
- Khazaie K, Prifti S, Beckhove P, Griesbach A, Russell S, Collins M, and Schirrmacher V: Persistence of dormant tumor cells in the bone marrow of tumor cell-vaccinated mice correlates with long-term immunological protection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (1994) 7430-7434

- Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, and Rapp UR: Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364 (1993) 249-252
- Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, and Vogel SN: Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 163 (1999) 1537-1544
- Kotlyarov A, Neiningner A, Schubert C, Eckert R, Birchmeier C, Volk HD, and Gaestel M: MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF-alpha biosynthesis. *Nat.Cell Biol.* 1 (1999) 94-97
- Kotlyarov A, Yannoni Y, Fritz S, Laass K, Telliez JB, Pitman D, Lin LL, and Gaestel M: Distinct cellular functions of MK2. *Mol.Cell Biol.* 22 (2002) 4827-4835
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, and Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53 (1988) 45-53
- Kumar S, Boehm J, and Lee JC: p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2 (2003) 717-726
- Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, and Olesen J: Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia* 18 (1998) 27-32
- Leff SE, Evans RM, and Rosenfeld MG: Splice commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression. *Cell* 48 (1987) 517-524
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996) 973-983

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996) 973-983
- Levite M: Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95 (1998) 12544-12549
- Levite M, Cahalon L, Hershkovich R, Steinman L, and Lider O: Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin. *J.Immunol.* 160 (1998) 993-1000
- Li Q, Wang J, Armant DR, Bagchi MK, and Bagchi IC: Calcitonin down-regulates E-cadherin expression in rodent uterine epithelium during implantation. *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 46447-46455
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, and Wesche H: IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase . *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002) 5567-5572
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, and Wesche H: IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase . *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002) 5567-5572
- Liu J, Chen M, and Wang X: Calcitonin gene-related peptide inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-12 release from mouse peritoneal macrophages, mediated by the cAMP pathway. *Immunology* 101 (2000) 61-67
- Mallee JJ, Salvatore CA, LeBourdelle B, Oliver KR, Longmore J, Koblan KS, and Kane SA: Receptor activity-modifying protein 1 determines the species selectivity of non-peptide CGRP receptor antagonists. *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 14294-14298
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, and Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin- receptor-like receptor. *Nature* 393 (1998) 333-339

- Medzhitov R and Janeway CA, Jr.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91 (1997) 295-298
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (1997) 394-397
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA, Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388 (1997) 394-397
- Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, and O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19 (2001) 683-765
- Morris HR, Panico M, Etienne T, Tippins J, Girgis SI, and MacIntyre I: Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. *Nature* 308 (1984) 746-748
- Moser M and Murphy KM: Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat.Immunol.* 1 (2000) 199-205
- Muff R, Born W, and Fischer JA: Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Eur.J.Endocrinol.* 133 (1995) 17-20
- Mulderry PK, Ghatgei MA, Rodrigo J, Allen JM, Rosenfeld MG, Polak JM, and Bloom SR: Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. *Neuroscience* 14 (1985) 947-954
- Muller M, Gounari F, Prifti S, Hacker HJ, Schirrmacher V, and Khazaie K: EblacZ tumor dormancy in bone marrow and lymph nodes: active control of proliferating tumor cells by CD8+ immune T cells. *Cancer Res.* 58 (1998) 5439-5446
- Mullins MW, Ciallella J, Rangnekar V, and McGillis JP: Characterization of a calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor on mouse bone marrow cells. *Regul.Pept.* 49 (1993) 65-72

- Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G, and Gaestel M: MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J.Biol.Chem.* 277 (2002) 3065-3068
- Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, and Matsumoto K: The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398 (1999) 252-256
- Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, and Legon S: A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin.Sci.(Lond)* 85 (1993) 385-388
- Nong YH, Titus RG, Ribeiro JM, and Remold HG: Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J.Immunol.* 143 (1989) 45-49
- Numao T and Agrawal DK: Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J.Immunol.* 149 (1992) 3309-3315
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, and Aderem A: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 13766 -13771
- Payan DG: Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Annu.Rev.Med.* 40 (1989) 341-352
- Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schutz G, Schindler H, Ulmer AJ, Heine H, Stelter F, Schutt C, Rothe G, Szollosi J, Damjanovich S, and Schmitz G: Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur.J.Immunol.* 31 (2001) 3153-3164

- Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, and Anderson P: TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 19 (2000) 4154-4163
- Poyner DR: Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol.Ther.* 56 (1992) 23-51
- Rameshwar P and Gascon P: Substance P (SP) mediates production of stem cell factor and interleukin-1 in bone marrow stroma: potential autoregulatory role for these cytokines in SP receptor expression and induction. *Blood* 86 (1995) 482-490
- Rosenfeld MG, Amara SG, Roos BA, Ong ES, and Evans RM: Altered expression of the calcitonin gene associated with RNA polymorphism. *Nature* 290 (1981) 63-65
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, and Evans RM: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 304 (1983) 129-135
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, and Akira S : Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappaB and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J.Immunol.* 171 (2003) 4304-4310
- Sato SM and Mains RE: The synthesis and processing of pro-ACTH/endorphin in the developing rat pituitary. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 512 (1987) 286-299
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, and Hiscott J: Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300 (2003) 1148-1151

- Shaw C: Neuropeptides and their evolution. *Parasitology* 113 Suppl (1996) S35-S45
- Shortman K and Liu YJ: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol.* 2 (2002) 151-161
- Stevens-Felten SY and Bellinger DL : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chem.Immunol.* 69 (1997) 99-131
- Stork PJ and Schmitt JM: Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12 (2002) 258-266
- Tan YR, Qin XQ, Guan CX, Zhang CQ, Luo ZQ, and Sun XH: Regulatory peptides modulate ICAM-1 gene expression and NF-kappaB activity in bronchial epithelial cells. *Sheng Li Xue.Bao.* 55 (2003) 121-127
- Tang Y, Feng Y, and Wang X: Calcitonin gene-related peptide potentiates LPS-induced IL-6 release from mouse peritoneal macrophages. *J.Neuroimmunol.* 84 (1998) 207-212
- Torgersen KM, Vang T, Abrahamsen H, Yaqub S, and Tasken K: Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. *Cell Signal.* 14 (2002) 1-9
- Torii H, Hosoi J, Beissert S, Xu S, Fox FE, Asahina A, Takashima A, Rook AH, and Granstein RD: Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J.Leukoc.Biol.* 61 (1997) 216-223
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, and Vogel SN: TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat.Immunol.* 3 (2002) 392-398
- Triantafilou K, Triantafilou M, Ladha S, Mackie A, Dedrick RL, Fernandez N, and Cherry R: Fluorescence recovery after photobleaching reveals that LPS rapidly transfers from CD14 to hsp70 and hsp90 on the cell membrane. *J.Cell Sci.* 114 (2001) 2535-2545

- Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, and Triantafilou K: Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J.Cell Sci.* 115 (2002) 2603-2611
- Turel KR and Rao SG: Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin by the human bone marrow stromal cells and its probable role in CD34(+) stem cell adhesion. *Cell Biol.Int.* 22 (1998) 641-648
- van Rossum D, Hanisch UK, and Quirion R: Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 21 (1997) 649-678
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, and Chen ZJ: TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412 (2001) 346-351
- Wang F, Millet I, Bottomly K, and Vignery A: Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 267 (1992) 21052-21057
- Wang X, Fiscus RR, Yang L, and Mathews HL: Suppression of the functional activity of IL-2-activated lymphocytes by CGRP. *Cell Immunol.* 162 (1995) 105-113
- Wang X, Ebong SJ, Call DR, Newcomb DE, Bolgos GR, and Remick DG: Calcitonin gene-related peptide partially reverses decreased production of chemokines KC and MIP-2 following murine sepsis. *Inflammation* 26 (2002) 167-174
- Weihe E, Nohr D, Michel S, Muller S, Zentel HJ, Fink T, and Krekel J: Molecular anatomy of the neuro-immune connection. *Int.J.Neurosci.* 59 (1991) 1-23
- Wimalawansa SJ, Emson PC, and MacIntyre I: Regional distribution of calcitonin gene-related peptide and its specific binding sites in rats with particular reference to the nervous system. *Neuroendocrinology* 46 (1987) 131- 136
- Wimalawansa SJ: Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev.Neurobiol.* 11 (1997) 167-239

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, and Akira S : Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J.Immunol. 169 (2002) 6668-6672

Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, and Akira S : Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J.Immunol. 169 (2002) 6668-6672

Yamazaki K and Allen TD: Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex". Am.J.Anat. 187 (1990) 261-276

Yewdell JW and Tschärke DC: Inside the professionals. Nature 418 (2002) 923-924

H: Danksagungen

Allen, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt an dieser Stelle mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Holzmann für die Bereitstellung des Themas, sein Interesse, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die jederzeit gewährte äußerst kompetente und freundliche Unterstützung.

Herrn Prof Dr. H. Kessler für die unkomplizierte Übernahme der Betreuung von dieser Arbeit.

Herrn Dr. med Ullrich Keller für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der humanen Myelopoese.

Herrn Dr. med. Kornelius Miething für die Transplantationen muriner Stammzellen.

Allen *Holzfrauen* und den *Quoten-Holzmänner* für die gute Stimmung im Labor und die problemlose Zusammenarbeit.

Anja, Bernadett, Monika und Sandra für das nette Arbeitsklima seit den 4a-Zeiten. In so mancher Happy Hour hat sich immer wieder gezeigt, dass „5“ eben eine runde Zahl ist.

Caro, die unsere Invasion aus der 4a mit einer Seelenruhe ertragen hat und immer ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen hatte.

Den Mädels aus dem "hinteren Labor", Anne, Bernadett, Caro, Dani, Monika, Tanja S. und den Mädels aus dem "Zellkulturlabor", Felicitas, Gabi, Kristina, Martina, Simone, Sylvie und Tanja R. sowie dem Nachwuchsoberrarzt Schorschi für die gute Zusammenarbeit

Heike und Sandra für das Korrekturlesen.

Sylvie und Simone für ihre Hilfe im Tierstall.

Monika R. für das Quatschen über den letzten Friseurtermin.

Klaus-Peter für die heitere und hilfreiche Arbeitsatmosphäre.

Den Medizinern Alex, Bobbi, Klaus E. und Klaus G. für so manche lustige Geschichte.