

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Einfluss von „Calcitonin Gene-Related Peptide“ und „Substance P“ auf die mRNA-Expression und Freisetzung von Zytokinen aus zerebralen Endothelzellen bei Kostimulation mit Pneumokokkenzellwänden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Ute-Stephani Sehmsdorf
aus Bad Langensalza

Dekan: Prof. Dr. med. J.W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. J. Weber
 2. Herr PD. Dr. med. Dipl-Psych. H. Mönnikes
 3. Herr Prof. Dr. med. habil. P. Oehme

eingereicht: 27.April 2001
Datum der Promotion: 22.Oktober 2001

In großer Dankbarkeit

meinen Eltern

Johanna und Christoph Sehmsdorf

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

0.0.	Abkürzungsverzeichnis	6
1.0.	Einleitung	9
1.1.	Bakterielle Meningitis	9
1.1.1.	Epidemiologie	9
1.1.2.	Klinik und Komplikationen der bakteriellen Meningitis	10
1.2.	Die Erreger	11
1.2.1.	Pneumokokken und ihre Zellwände (PCW)	11
1.3.	Pathologie und Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis	11
1.4.	Die Rolle der zerebralen Endothelzellen bei der Inflammation	12
1.5.	Zytokine bei Meningitis	13
1.6.	Das Trigemino-vaskuläre System (TVS)	17
1.6.1.	Aktivierung des Trigeminus	18
1.6.2.	Die physiologische Rolle und klinische Bedeutung des TVS	19
1.6.3.	Die Rolle des TVS bei der Neuroinflammation	19
1.7.	Neuropeptide	20
1.7.1.	Tachykinin - Substanz P (SP)	21
1.7.2.	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	23
1.7.3.	Adrenomedullin (AM)	25
1.8.	Hypothesen	28
2.0.	Material und Methoden	29
2.1.	Zellkulturen	29
2.1.1.	Primärkulturen der zerebralen Kapillarendothelzellen	29
2.1.2.	Die Zell-Linie L929	30
2.2.	Die Stimulation der Zellkulturen	30
2.2.1.	Materialien	30
2.2.2.	Durchführung der Stimulation	32

2.3.	RNA Isolation	32
2.3.1.	Materialien	32
2.3.2.	Durchführung der RNA-Isolation	33
2.4.	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	36
2.4.1.	Materialien	36
2.4.2.	Durchführung	36
2.5.	Reverse Transkriptase (RT)-PCR	37
2.5.1.	Materialien	38
2.5.2.	Semiquantitative β -Actin PCR	38
2.5.3.	Semiquantitative Zytokin PCR	39
2.5.4.	PCR ohne kompetitives Kontrollfragment	40
2.6.	Auswertung der PCR Produkte	41
2.6.1.	Material und Methode	41
2.7.	Die Bestimmung von TNF- α mit TNF- α -Bioassay	43
2.8.	Quantitative Bestimmungen der Zytokine mit dem ELISA	44
2.9.	Quantitative Bestimmung von SP und SP ₁₋₇ mit dem RIA	44
2.9.1.	Materialien und Methodik	44
2.10.	Bestimmung von Adrenomedullin(1-50) Enzym immunoabsorbet assay (EIA)	47
2.11.	Angewendete statistische Verfahren	47
2.12.	Darstellung der Ergebnisse	47
2.12.1.	Darstellung der Ergebnisse über den Einfluss von CGRP/CGRP ₈₋₃₇ und SP/ SR140 333 auf die Zytokin mRNA-Expression und Freisetzung	47
2.12.2.	Darstellung der Ergebnisse der CRLR- und AM mRNA Expression	48
3.0.	Ergebnisse	49
3.1.	Charakterisierung der β -Actin mRNA-Expression	49
3.2.	Einfluss von CGRP und CGRP ₈₋₃₇ sowie SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2	50
3.2.1.	Einfluss von CGRP und CGRP ₈₋₃₇ auf die mRNA-Expression und Freisetzung der Zytokine	50

3.2.2.	Einfluss von SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und - Freisetzung	62
3.2.3.	SP 1-4 N-terminales Fragment	71
3.3.	CRLR (A-CGRP1) mRNA-Expression	72
3.3.1.	Einfluss von PCW auf die CRLR-mRNA-Expression im Zeitverlauf	72
3.3.2.	Regulation der CRLR mRNA-Expression bei PCW-Stimulation unter Zugabe von CGRP und CGRP ₈₋₃₇ nach 4 h und 6 h	73
3.4.	Adrenomedullin (AM)-mRNA-Expression	74
3.4.1.	Einfluss von PCW auf die AM-mRNA-Expression im Zeitverlauf	74
3.4.2.	Regulation der AM-mRNA-Expression bei PCW-Stimulation und Zugabe von CGRP und CGRP ₈₋₃₇ nach 4 h und 6 h	75
3.5.	Einfluss von PCW und CGRP auf die Adrenomedullin (1-50) Protein-Freisetzung aus zerebralen Endothelzellen	78
3.6.	Vergleich der SP ₁₋₁₁ und SP ₁₋₇ (Fragment) Konzentrationen in den Zellkulturüberständen	80
4.0.	Diskussion	86
4.1.	Einfluss von CGRP auf die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2	87
4.2.	Einfluss von SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2	93
4.3.	Regulation des „Calcitonin Related-Like Receptor“ (CRLR)	97
4.4.	Adrenomedullin (AM)-mRNA-Expression und Freisetzung	98
4.4.1.	AM (1-50) - TNF- α	99
4.5.	SP ₁₋₁₁ und SP ₁₋₇ Konzentrationen in Zellkulturüberständen	100
5.0.	Zusammenfassung	102
6.0.	Literaturverzeichnis	105

0.0. Abkürzungsverzeichnis

AM	Adrenomedullin
AU	Willkürlich gewählte Einheit, Arbitrary Unit
AMR-L1	Adrenomedullinrezeptor
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BM	Basalmembran
BSA	Rinderalbumin; bovine serum albumin
cfu	Kolonieformende Einheiten, colony forming units
cDNA	Komplementäre DNS, Complementary desoxyribonucleic acid
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CRLR	Calcitonin receptor-like receptor (CGRP1 Rezeptor)
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium - modifikation
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinsäure, desoxyribonucleid acid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECGF	Endothelzell-Wachstumsfaktor; Endothelial cell growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzyme-Immunoassay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FKS	fötales Kälberserum

ICAM	intrazelluläres Adhäsionsmolekül; intercellular adhesion molecule
ICP	intrakranieller Druck, intra cranial pressure
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO- Synthase
KF	Kontrollfragment
LPS	Lipopolysaccharid
MEKK	Map-und Erk-Kinase-Kinase
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
M MLV-RT	Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, Messenger ribonucleid acid
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht, molecular weight
NEP	Neutralendopeptidase , Endopeptidase 24.11
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B, Nuclear Faktor κ B
NK-1	Neurokinin Rezeptor (1), Rezeptor für SP
NO	Stickstoffmonoxid, Nitric Oxide
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung, Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, Polymerase chain reaction
PCW	Zellwände, Pneumococcal cell walls
PNS	Peripheresnervensystem
RAMPs	Receptor-activity-modifying proteins
RDC-1	CGRP1 Rezeptor von Kapas kloniert

RIA	Radio Immunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute, Rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure, ribosomal ribonucleid acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	ReverseTranskriptions-Polymerasekettenreaktion, reverse transcription polymerase chain reaction
SAS	Subarachnoidalraum, subarachnoid space
SDS	Natriumdodecylsulfate; Sodiumdodecylsulfate
SP	Substanz P
SPE	Substanz P Endopeptidase
<i>S. pneum.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SR140333	Non Peptid NK-1 Rezeptorantagonist der Firma Sanofi
Tiv	Tag in vitro
TNF- α	Tumor-Nekrose-Factor- α
TVS	Trigeminovaskuläres System
ZNS	Zentralnervensystem

1.0. Einleitung

1.1. Bakterielle Meningitis

Die bakterielle Meningitis ist die häufigste und schwerste Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) [Leib & Täuber, 1999a]. Meningitis wird verursacht durch die bakteriellen Erreger wie *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* [Schuchat et al., 1997]

Trotz des therapeutischen Einsatzes von Antibiotika ist die bakterielle Meningitis immer noch eine Erkrankung mit überraschend hoher Mortalität zwischen 20–30 % und hoher Morbidität bis zu 50 % [Durand et al., 1993; Bohr et al., 1983 a, b; 1984].

Eine Verbesserung der Situation durch den Einsatz von optimierten Antibiotika ist nicht zu erwarten, dafür gibt es zwei Gründe. Auf der einen Seite besteht das Problem der Antibiotika-Resistenz. So kam es in den letzten 5-7 Jahren in den USA zu einem 60fachen Anstieg von nun über 20 verschiedenen Antibiotika-resistenten Pneumokokken-Stämmen [Butler et al., 1996]. In Spanien [Fenoll et al., 1991], Ungarn [Marton et al., 1991] und Südafrika [Friedland & Klugman, 1992] beträgt die Rate der Penicillin-unempfindlichen Pneumokokken-Stämme zwischen 40 und 70 %. Der zweite wesentliche Punkt ist, dass durch die Antibiose in jedem Falle eine überdurchschnittliche Immunantwort induziert wird, die wiederum zur Schädigung des Gehirnes führen kann. Genaues Verständnis dieser Kaskade könnte die Entwicklung von adjuvanten Therapiestrategien ermöglichen und damit zu einer Verbesserung der Prognose der Erkrankung führen.

1.1.1. Epidemiologie

Die Inzidenz der akuten bakteriellen Meningitis in den USA beträgt ca. 3 Fälle pro 100 000 Personen pro Jahr. Die Inzidenz der Pneumokokken-Meningitis liegt bei ca. 1,1 pro 100 000 Personen [Schuchat et al., 1997], wobei die höchste Inzidenz bei Kindern unter 5 Jahren in Europa, Nordamerika und Asien mit durchschnittlich 7 pro 100 000 Personen zu verzeichnen ist [Gold, 1999]. Eine Ausnahme bildet die höhere Inzidenz von 84 Fällen pro 100 000 in dieser Altersgruppe unter den Eskimos in Alaska [Davidson et al., 1994]. Danach folgt die Altersgruppe der über 60-Jährigen mit einer Erkrankungsrate von 1,9 pro 100 000 Personen [Schuchat et al., 1997].

1.1.2. Klinik und Komplikationen der bakteriellen Meningitis

Die typischen Zeichen der Meningitis wie Fieber, Kopfschmerzen und Nackensteife (Meningismus) sind in ca. 80 % der Fälle vorhanden und werden von anderen Symptomen wie Lichtempfindlichkeit, Erbrechen bis hin zur Bewusstseinstörung, begleitet. Bei Kleinkindern unter 2 Jahren und im Alter können Fieber und/oder Veränderungen des Bewusstseinszustandes oder Persönlichkeitsveränderungen nur wenig oder unspezifisch ausgeprägt sein.

Bei älteren Kindern und Erwachsenen sind die klinisch-neurologischen Beschwerden des ZNS wie Kopfschmerzen, Photophobie, Nacken- und Rückenschmerzen stärker ausgeprägt.

Unbehandelt führt die bakterielle Meningitis über zunehmende Bewusstseinstörung und neurologische Ausfälle zum Koma und schließlich zum Tod. Der Grad der Bewusstseinstörung erlaubt eine Beurteilung der Schwere der Erkrankung und der entsprechenden Prognose [Leib & Täuber, 1999 b; Kaplan, 1999].

Die Hauptkomplikationen für das ZNS während der akuten Phase der Meningitis bei Erwachsenen sind das Hirnödem, der Hydrocephalus, die zum erhöhten intrazerebralen Druck (ICP) beitragen und seltenere vaskuläre Komplikationen wie die Vaskulitis oder Sinusvenenthrombose sowie fokale Ausfälle und epileptische Anfälle.

Zu den systemischen Komplikationen der fulminanten bakteriellen Meningitis zählen die Sepsis mit den entsprechenden Komplikationen wie den septischen Schock, die disseminierte intravasale Gerinnung und das akute Lungenversagen „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) [Pfister et al., 1993].

Chronische Folgen der bakteriellen Meningitis bei Kindern sind vor allem epileptische Anfälle und eine sensorische Hörminderung [Pomeroy, 1990], sowie Hirnschäden mit oder ohne geistige Behinderung [Schuchat et al., 1997]. Ca. 33 % der Erwachsenen und ca. 21 % der Schulkinder, die eine bakterielle Meningitis überleben, sind in ihrer Arbeitsfähigkeit bzw. Lernfähigkeit beeinträchtigt [Bohr et al., 1983b].

1.2. Die Erreger

Die häufigsten Erreger der bakteriellen Meningitis sind nach dem Verschwinden der *H. influenzae*-Meningitis durch Impfung, Pneumokokken, Meningokokken sowie Listerien. Die Pneumokokken-Erkrankung ist die häufigste im Erwachsenen Alter und hat insgesamt die schlechteste Prognose. Aus diesem Grunde konzentrierte ich mich in der vorgelegten Arbeit auf *Streptococcus pneumoniae*.

S. pneumoniae sind ca. 1-3 µm lang und gehören zu den α-hämolisierenden Streptokokken. Sie erscheinen als lanzettförmige Diplokokken und färben sich grampositiv (blau) an. Grampositive Bakterien bestehen aus einer mehrschichtigen Peptidoglykan-Zellwand aus Murein, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmureinsäure die β-glykosidisch zu Ketten verbunden sind und Lipoteichonsäuren enthalten. Eine doppelschichtige Lipidschicht bildet die Zytoplasma-Membran. Das Genom besteht aus einer doppelsträngigen ringförmigen DNA ohne Introns. Pneumokokken können unbekapselt sein, besitzen aber in der Mehrheit eine antiphagozytäre Polysaccharidkapsel [Miksits et al., 1992].

1.2.1. Pneumokokken und ihre Zellwände (PCW)

Nur bekapselte Stämme sind pathogen, da sie durch die Kapsel die zelluläre Immunantwort der Phagozytose hemmen [Miksits et al., 1992]. Gereinigte Zellwände führen nach intrazisternaler Verabreichung zu einer Entzündungsreaktion die der bakteriellen Meningitis vergleichbar ist. Dies wurde am Kaninchen [Tuomanen et al., 1985] und an der Ratte [Pfister et al., 1992; Weber et al., 1995] experimentell gezeigt. Diese Beobachtungen sind von großer Bedeutung, da die Abtötung der Bakterien zur Freisetzung von Zellwänden führt und deren Konzentration auch mit der Prognose der Erkrankung korreliert [Schneider et al., 1999].

1.3. Pathologie und Pathogenese der Pneumokokken-Meningitis

Zu den wichtigsten pathologischen Befunden der befallenen Gehirne gehören die intensive Entzündung des subarachnoidalen- und ventrikulären Liquorraumes, der entzündliche Befall der Hirngefäße und der Gewebeschaden des Gehirns. Im Subarachnoidalraum (SAS) befindet sich granulozytärer Eiter, welcher die Hirnbasis und die hemisphärischen Konvexitäten bedeckt. Die zerebrale Vaskulitis ist oft schon makroskopisch erkennbar und zeigt histologisch eine entzündliche Infiltration der Gefäßwand mit Ausbildung von Thromben. Gewebeschaden manifestiert sich als Ödem, das zur Hirneinklemmung und zum ischämisch-

nekrotischen Zelluntergang führen kann [Quagliarello & Scheld, 1992].

Die Entwicklung und das Fortschreiten der bakteriellen Meningitis erfolgt in 4 Phasen. Die Übertragung der Bakterien geschieht meist über den Respirationstrakt. In der 1. Phase kommt es nach nasopharyngealer Kolonisation und Invasion der Pneumokokken in die Blutbahn zur Infektion des ZNS. Die Invasion wird begünstigt durch oberflächlich antiphagozytär wirkende Polysaccharidkapselproteine und bakterielle Enzyme. Nach Penetration der BHS vermehren sich die Bakterien in der 2. Phase im Ventrikelraum und SAS und lösen eine Entzündung aus. In der 3. Phase kommt es im Rahmen der Abwehrreaktion zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die wiederum zur Einwanderung von Leukozyten in die befallenen Regionen führen. Im weiteren Verlauf der pathophysiologischen Wechselwirkungen der Entzündungsreaktionen kommt es in der 4. Phase zur zerebralen Schädigung durch Ischämie, toxisch wirkende exzitatorische Transmitter wie z.B. Glutamat, Zytokine, NO und Sauerstoffradikale [Leib & Täuber, 1999c].

1.4. Die Rolle der zerebralen Endothelzellen bei der Inflammation

Die aus dem Blut kommenden Pneumokokken und andere Bakterienbestandteile müssen die BHS überwinden, um eine Meningitis auslösen zu können. Dabei bilden die zerebralen Endothelzellen möglicherweise die Eintrittspforte ins Hirnparenchym. Ein sehr komplexes Wechselspiel zwischen den bakteriellen Komponenten und den zerebralen Endothelzellen ermöglicht es den Pneumokokken die BHS zu überwinden. So kommt es als Reaktion auf den entzündlichen Stimulus zu einer Hochregulierung von TNF- α , Chemokinen und später Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1 [Freyer et al., 1999]. Die Aktivierung und TNF-Produktion regelt möglicherweise der Plättchen aktivierende Faktor (PAF). Pneumokokken sind in der Lage durch eine PAF-abhängige Transzytose die BHS zu überwinden und so eventuell in den SAS zu gelangen [Ring et al., 1998]. Mit der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen ist eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten verbunden. Die Adhäsion wird auch durch einen erhöhten zerebralen Blutfluss in der frühen Phase der Meningitis begünstigt. Die Interaktion von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen ist an verschiedenen Modellen gut untersucht worden und wird als Leukozyten-Endothel-Adhäsions-Kaskade bezeichnet [Buchter, 1991; McEver, et al., 1995; Quagliarello & Scheld., 1992]. Die initiale Phase der Adhäsionskaskade, das Leukozyten-Rolling, wird vermittelt durch P- und L-Selektine. Dabei binden sich die Leukozyten nur leicht an das Endothel und „rollen“ mit verringerter Geschwindigkeit an der Gefäßwand entlang. Die P-Selektine werden

auf den Endothelzellen und die L-Lektine auf den Leukozyten exprimiert. P-Selektin wird im Ruhezustand in sekretorischer Granula der Endothelzellmembran gespeichert und bei Aktivierung der Zellen sehr schnell auf der Oberfläche verteilt. Einige inflammatorische Mediatoren erhöhen gleichzeitig auch die Synthese der P-Selektine. Die Selektine reagieren mit Oligosacchariden auf der Oberfläche der Leukozyten bzw. Endothelzellen [Nelson et al., 1993]. Durch das „Rolling“ verändert sich die Morphologie der Leukozyten, das Anheften der Leukozyten an die Oberfläche der Endothelzellen wird somit begünstigt. Bei diesem Prozess ist die Interaktion von aktivierten CD11/CD18-Integrinen (auf der Oberfläche der Leukozyten) mit den Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie z.B. interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) erforderlich. ICAM-1 ist konstitutiv auf der Endothelzellmembran präsent. Wir konnten zeigen, dass die Expression von ICAM-1 auf den zerebralen Endothelzellen nach Stimulation mit PCW oder TNF- α via „autocrinen loop“ verstärkt wird [Freyer et al., 1999].

1.5. Zytokine bei Meningitis

Zytokine sind regulatorische Proteine, die von einer Vielzahl von Zellen produziert werden können. Zu ihren Hauptfunktionen gehören die Modulation der Immunantwort und die Steuerung von inflammatorischen Prozessen. Wesentliche gemeinsame Eigenschaften der Zytokine sind von Benveniste [„Neuroglia“, 1995] nachfolgend zusammengefasst:

1. Sie haben ein geringes Molekulargewicht.
2. Sie werden meist nicht konstitutiv produziert. Erst ein Aktivierungssignal löst die Gentranskription aus.
3. Zytokine werden in der Regel sezerniert, sie können aber auch als Oberflächenmoleküle exprimiert werden.
4. Ein bestimmtes Zytokin kann durch verschiedene Zellen produziert werden und hat seinerseits vielfältige biologische Wirkungen.
5. Verschiedene Zytokine können bei einer Zelle gleichartige Wirkungen hervorrufen (Redundanzprinzip).
6. Zytokine wirken eher lokal und entfalten ihre Wirkung nach Bindung an den spezifischen Oberflächenrezeptor.
7. Zytokinrezeptoren zeigen eine hohe Affinität für ihre Liganden (K_d im Bereich von 10^{-10} und 10^{-12}).

Im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesse stehen bei der Meningitisforschung drei Gruppen:

1. die proinflammatorischen Zytokine: TNF- α , IL-1 β , IL-6
2. die antiinflammatorischen Zytokine: IL-10, TGF- β , IL-6
3. die chemotaktischen Zytokine (Chemokine): IL-8, MCP-1 (MIP-1 und 2)

Erhöhte Konzentrationen an TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-10 im Liquor sind charakteristisch für Patienten mit bakterieller Meningitis. Häufig korrelieren die Konzentrationen mit der Schwere der Klinik und der Prognose [Waage et al., 1989; Rieckmann et al., 1995; Lehmann et al., 1995]. In weiteren experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Zytokine als Mediatoren an diesen frühen pathophysiologischen Veränderungen beteiligt sind [Mustafa et al., 1989; Quagliariello et al., 1991]. Der Entzündung und Exsudation von Proteinen nach intrazisternaler Injektion von LPS geht eine rasche Freisetzung von TNF- α , IL-1, und IL-6 in den Liquor voraus [Waage et al., 1989]. Die direkte Injektion der Zytokine TNF- α und IL-1 β in den Liquorraum von Ratten bzw. Kaninchen führt zur Entzündung und Störungen der BHS in zeit- und dosisabhängigen Mustern [Ramilo et al., 1990; Angstwurm et al., 1998]. Eine gleichzeitige Gabe von Antikörpern gegen die entsprechenden Zytokine reduziert die inflammatorische Reaktion [Ramilo et al., 1990].

Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α)

TNF- α ist ein Glykoprotein, das für inflammatorische Prozesse das bedeutendste Zytokin darstellt. Wir konnten zeigen, dass TNF- α von zerebralen Endothelzellen und Astrozyten [Freyer et al., 1999; 1996] sowie von Mikroglia [Chao et al., 1992] sezerniert wird. TNF- α wird durch das Konversionsenzym Metalloproteinase von der inaktiven Membran-gebundenen Form in die aktive lösliche Form konvertiert [Gearing et al., 1994; Rosenberg et al., 1995; Moss et al., 1997; Black et al., 1997].

TNF-mRNA wird bereits nach 2 h auf Pneumokokken-Stimulus hin gebildet [Diab et al. 1997]. Bei Stimulation von zerebralen Endothelzellen mit PCW zeigt sich sogar bereits nach 2 h ein mRNA-Maximum. Weitere von uns durchgeführte in-vitro Experimente haben belegen können, dass PCW-induziertes TNF- α maßgeblich für die Expression von ICAM-1- und iNOS in zerebralen Endothelzellen verantwortlich ist [Freyer et al., 1999]. In einem experimentellen Meningitis-Modell der Ratte führen intrazisternale Injektionen von *S. pneumoniae* nach 12 h zu einer Maximalkonzentration an TNF- α im Liquor. Die erhöhten

Werte persistieren oft bis zu weiteren 12 h. Die lang andauernde TNF- α -Aktivität ist möglicherweise durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus in der Entzündungskaskade oder durch einen kontinuierlichen Stimulus von den von Bakterien freigesetzten PCW oder anderer bakterieller Komponenten in den Liquorraum erklärbar. Dafür spricht, dass nach initialer Antibiotikatherapie es zu einer rapiden Lysis der Bakterien, und demzufolge zu einer Freisetzung von PCW und anderen Zellwandprodukte kommt, dies ist wiederum assoziiert mit einer signifikant höheren TNF- α -Konzentration im Liquor [Leib & Täuber, 1999c; Mustafa et al., 1990].

Verabreichung von TNF- α in den SAS führt zu verschiedenen pathophysiologischen Veränderungen, wie z.B. neutrophiler Entzündungsreaktion, Veränderungen des zerebralen Metabolismus und Sauerstoffverbrauch sowie zur Erhöhung des regionalen zerebralen Blutflusses [Andersson et al., 1992; Angstwurm et al., 1998; Galbinski et al., 1998; Liu et al., 1994; Rosenberg et al., 1995]. Intrazerebrale Injektionen von TNF- α dagegen führen durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen zur dosisabhängigen Permeabilität der BHS [Rosenberg et al., 1995]. TNF- α ist außerdem in der Lage, die Apoptose von Neuronen im Hippocampus zu induzieren [Bogdan et al., 1997].

Interleukin-1 (IL-1)

IL-1 ist ein potentes Pyrogen. Obwohl es die BHS nicht passiert, kann es -wahrscheinlich über zirkumventrikuläre Organe und die durch Produktion von sekundären Mediatoren gekennzeichnete Wirkung auf Endothelzellen- sehr schnell Fieber, Schlaf und die Freisetzung von verschiedenen Neuroeptiden bewirken [Dinarello et al., 1994].

Im ZNS wird IL-1 von Mikroglia, Astrozyten, Oligodendrozyten und wahrscheinlich auch von Neuronen freigesetzt [Arai et al., 1990; da Cunha et al., 1993; Tchelingierian et al., 1993]. In eigenen Untersuchungen konnten wir beobachten, dass zerebrale Endothelzellen, nach Stimulation mit PCW, IL-1 β zeitgleich mit TNF- α und anderen Zytokinen synthetisieren und sezernieren.

IL-1 erscheint bereits 30 min nach intrazisternaler Injektion von *H. influenzae*-Lipooligosaccharid im Liquor [Quagliarello et al., 1991]. Wird IL-1 direkt in den SAS von Kaninchen injiziert, so leitet es eine meningiale Inflammation ohne messbare TNF- α -Aktivität ein. Wird dagegen TNF- α und IL-1 gleichzeitig appliziert, zeigt sich ein synergistischer Effekt bezüglich einer verstärkten Pleozytose im Liquor. IL-1 wie auch

TNF- α sind in der Lage, sekundäre Zytokine wie IL-6, IL-10 und IL-8 zu induzieren [Waage et al., 1989].

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 wird im wesentlichen auf Reiz von LPS, PCW, Zytokinen von Mikroglia, Astrozyten [Benveniste et al., 1990; Frei et al., 1989; Aloisi et al. 1992] und zerebralen Endothelzellen [eigene Ergebnisse] freigesetzt. IL-6 ist während Meningokokken-Meningitis im Liquor später präsent als TNF- α und IL-1, dafür ist es aber längere Zeit nachweisbar [Waage et al., 1989]. Obwohl IL-6 bei Patienten mit Meningitis messbar ist, korreliert es weder mit Zeichen der meningialen Entzündung noch mit der Schwere der Klinik [Rusconi et al., 1991].

IL-6 hat vor allem proinflammatorische Eigenschaften, da es ein potenter Induktor von „Akute Phase Proteine“, Fieber und Leukozytose ist. Gleichzeitig aktiviert es das Komplement- und Gerinnungssystem [Hirano et al., 1990]. Einige antiinflammatorische Wirkungen von IL-6 sind beispielsweise die Inhibition der TNF- α -Expression von Astrozyten [Benveniste et al., 1995], sowie die Induktion des löslichen TNF- α -Rezeptor und IL-1-Rezeptor-Antagonist [Tilg et al., 1994].

Für die BHS ist IL-6 ein bedeutendes Zytokin, da es das BHS-Markerenzym Alkalische Phosphatase in Endothelzellen induziert und eine Rolle bei der Proliferation von Gefäßmuskelzellen und Angiogenese spielt [Nabata et al., 1990; Meir, 1995; Takemoto, 1994].

Interleukin-10 (IL-10)

Murine Astrozyten und Mikroglia sind dazu befähigt IL-10 zu synthetisieren [Mizuno, 1994]. In eigenen, noch unveröffentlichten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass auch zerebrale Endothelzellen nach Stimulation mit PCW, IL-10 freisetzen.

IL-10 ist ein antiinflammatorisch wirkendes Zytokin, das die Produktion von TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 von Monozyten *in-vitro* hemmt [de Waal-Malefyt et al., 1991]. Wie aber IL-10 auf molekularer Ebene Einfluss auf die Synthese der proinflammatorischen Zytokine bei Meningitis nimmt, bleibt noch unklar.

In experimenteller *H. influenzae*- und *L. monocytogenes* -Meningitis führen Applikationen von IL-10 zur Reduktion der TNF- α - und Laktat-Konzentration und schwächen so die Entzündung im SAS ab [Paris et al., 1997]. Wird IL-10 systemisch bei experimenteller

Pneumokokken-Meningitis appliziert, führt es zur Abschwächung des erhöhten zerebralen Blutflusses, des intrakraniellen Druckes, des Hirnödems und der Leukozytose im Liquor. [Koedel et al., 1996].

Chemokine - Interleukin 8 (IL-8) und „Makrophage inflammatory protein“ (MIP-2)

Chemokine werden hauptsächlich in zwei große Klassen eingeteilt: C-X-C und C-C Chemokine. Die C-X-C Chemokine ziehen vorwiegend neutrophile Leukozyten an, während C-C Chemokine bevorzugt Monozyten und T-Lymphozyten chemotaktisch anlocken [Horuk, 1994]. Zellen wie Monozyten/Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten, Neuronen, Mikroglia, Astrozyten, und Endothelzellen produzieren auf Stimulus von TNF- α , IL-1 oder bakteriellen Komponenten Chemokine beider Klassen. Im Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis wurden vor allem IL-8, ein C-X-C- Chemokin, sowie „monocyte chemotactic protein-1“ (MCP-1) und MIP-1 α/β , Chemokine der Klasse C-C, in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen. Rantes, eine Untergruppe der C-C Klasse, welche vorwiegend auf T-Lymphozyten wirken und von ihnen gebildet werden, sind bei bakterieller Meningitis nicht erhöht [Spanaus et al., 1997]. Neben der Chemotaxis können Chemokine auch die Expression von Adhäsionsmolekülen bewirken, sowie deren Bindungsaktivität modulieren, um so Leukozyten spezifisch zu aktivieren. [Adams & Schaw, 1994]. Bei experimenteller Meningitis führt die intrazisternale Gabe von MIP-1 (C-C Chemokin) und MIP-2 (C-X-C Chemokin) zu einer erhöhten Leukozytenzellzahl und höherer Proteinkonzentration im Liquor und verstärkt das Hirnödem. MIP-2 ist spezifisch für Maus und Ratte und entspricht dem humanen IL-8 [Saukkonen et al., 1990; Seebach et al., 1995].

1.6. Das Trigeminovaskuläre System (TVS)

Das Trigeminovaskuläre System stellt die Schlüsselrolle der zerebrovaskulären Physiologie dar. Die zerebralen Blutgefäße werden durch afferente überwiegend unmyelinisierte C-Fasern und schwach myelinisierte A δ -Fasern des Trigemini (V. Hirnnerv) innerviert. Die Fasern gehen vom *Ganglion trigeminale* aus, in dem sich die Zellkörper befinden. Das Ganglion enthält bipolare Zellen, die mit ihrem antidrom leitendem Axon synaptisch mit den Blutgefäßen und anderen kranial gelegenen Strukturen verbunden sind, während die zentral projizierenden Fasern orthodrom zum 2. Neuron dem *Nucleus spinalis nervi trigemini* im Rautenhirn oder oberen zervikalen Rückenmark leiten [Kaube et al., 1993]. Schmerz von den Blutgefäßen und der Dura mater wird hauptsächlich von den Trigemini Fasern afferent geleitet. Die meisten schmerzleitenden Fasern befinden sich im *Nervus ophthalmicus* (NV1)

dem ersten Ast des Trigeminus. Der NV1 ist rein sensibel, verläuft nahe der *Carotis interna* über den lateralen Wand des *Sinus cavernosus* durch die *Fissura orbitalis superior* in die Orbita, wo er sich in weitere vier Äste verzweigt. Diese innervieren vorwiegend das Frontalhirn, indem sie die *Arteria cerebri anterior*, *A. cerebri media* und deren Äste begleiten. Aber die Nervenfasern weiten sich auch nach rostral bis posterior der *A. basilaris* aus. Die kaudalen Blutgefäße werden überwiegend von den Fasern der dorsalen Spinalnerven C2 und C3 innerviert [You et al., 1995]. In den Auftreibungen der Trigeminusaxone sind u.a. Neurotransmitter enthalten. Bisher konnten vier Neuropeptide bestimmt werden. Diese sind die Tachykinine Neurokinin A (NKA) und Substanz P (SP), sowie „Calcitonin-gene-related peptide“ (CGRP) und Cholecystokinin (CCK) [Goadsby et al., 1997]. Tachykinine und CGRP besitzen starke vasodilatatorische Eigenschaften.

1.6.1. Aktivierung des Trigeminus

Durch ein *in-vitro* Modell gibt es Hinweise, dass die Stimulation von perivaskulären trigeminalen Fasern zur Freisetzung von SP führt -möglicherweise bedingt durch eine depolarisationsabhängige Aktivierung von trigeminalen Neuronen. Für NKA und CGRP konnte dies bisher nicht gezeigt werden.

Seit Jahren ist bekannt, dass nach einem Eingriff am trigeminalen Ganglion durch Thermokoagulation oder alkoholische Injektion eine Vasodilatation (Rötung) des Gesichtes auftritt, die von einem Temperaturanstieg von 1-2 °C begleitet wird. Korrelierend dazu fand sich eine erhöhte Konzentration an SP und CGRP in der externen Jugularis, jedoch nicht im peripheren Blutkreislauf. Eine ähnliche Beobachtung konnte an Katzen gemacht werden, bei denen eine Manipulation am *Ganglion trigeminale* zur Herabsetzung des Gefäßwiderstandes der Karotis mit anschließender Erhöhung des Blutflusses und der Gesichtstemperatur führte. Der Mechanismus ist durch den Axonreflex erklärbar [Goadsby & Edvinsson, 1997]. Der Axonreflex ist eine Besonderheit der unmyelinisierten C-Fasern. Man geht davon aus, dass die Fasern die Nozizeption nicht nur zentripetal (orthodrom) leiten, sondern dass sich die Erregung auch zentrifugal (antidrom) in Verzweigungen der nozizeptiven Fasern fortsetzt und schließlich zu einer Freisetzung von Transmittern führt, welche über den interstitiellen Raum die glatten Gefäßmuskelwände erreichen und dort eine Vasodilatation auslösen [Zilles & Rehkämper (a), 1994].

1.6.2. Die physiologische Rolle und klinische Bedeutung des TVS

Das Trigemino-vaskuläre System stellt ein Art Warnsystem für Änderungen des zerebralen Blutflusses dar, insbesondere dann wenn die zerebrale Blutzirkulation bedrohlich gestört wird. Das TVS ist primär nicht an der Aufrechterhaltung des physiologischen zerebralen Blutflusses beteiligt. Erst in abnormen Situationen wie z.B. bei epileptischen Anfällen oder nach Durchbrechen der oberen Grenze der physiologischen Blutdruckautoregulation, kommt das TVS zur Wirkung. Das TVS wirkt dem vasokonstriktorisches sympathischen Nervensystem, vertreten durch seinen Neurotransmitter Noradrenalin, entgegen [McCulloch et al., 1986]. Bei Subarachnoidalblutung (SAB) schwächt es den Vasospasmus antagonistisch ab. Pathophysiologisch spielt das TVS vor allem bei Migräne und Cluster-Kopfschmerz eine Rolle, sowohl bei der Schmerzvermittlung als auch bei der Freisetzung von CGRP und SP in die zerebrale Blutzirkulation [Goadsby et al., 1990; Goadsby & Edvinsson, 1994].

1.6.3. Die Rolle des TVS bei der Neuroinflammation

Während der Entzündungsreaktion kommt es zur Freisetzung von Neuropeptiden. So führen Zytokine zur vermehrten Expression von Eikosanoiden durch Induktion von Cyclooxygenase und Phospholipase A2. Die gebildeten Prostaglandine PGE2 und PGI2 sensibilisieren die afferenten C-Schmerzfasern mit darauffolgender Freisetzung von SP und CGRP [Rothwell & Hopkins, 1995]. Übereinstimmend konnten wir in Liquorproben von Patienten mit bakterieller Meningitis eine erhöhte CGRP Konzentration messen [Hoffmann et al., 2001]. Bei der Meningitis ist das TVS hauptsächlich für die Entstehung von Kopfschmerzen verantwortlich und führt zu einem erhöhten zerebralen Blutfluss in der frühen Phase der Meningitis [Pfister et al., 1990; Weber et al., 1995, 1996]. Kopfschmerzen entstehen durch Aktivierung der C-Fasern des Trigeminusnervs, welche die zerebralen Blutgefäße [Suzuki et al., 1989] und Meningen [Buzzi et al., 1991] innervieren. Die Aktivierung des Trigeminus ist verbunden mit der Freisetzung von Neuropeptiden (SP, CGRP) in den interstiellen perivaskulären Raum.

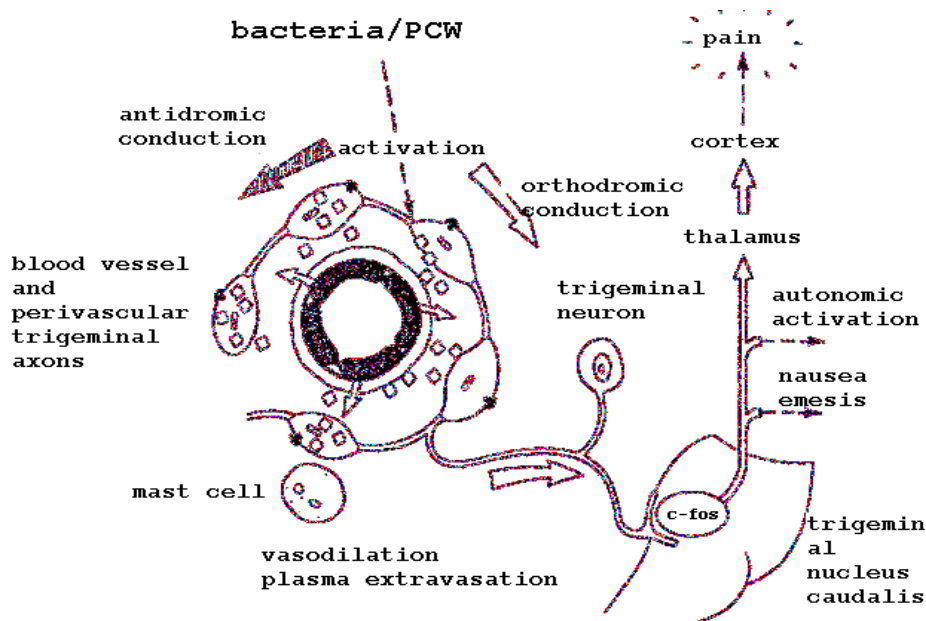


Abb. 1: mögliche Rolle des Trigemino-vaskulären Systems bei bakterieller Meningitis

1.7. Neuropeptide

Neuropeptide sind Peptide, die im Perikaryon synthetisiert werden und langsame, lang anhaltende endo- und parakrine Effekte vermitteln (Neuromodulatoren). Sie kommen in allen Abschnitten des Nervensystems vor. Sie können mit klassischen Transmittern zusammen im selben Axonterminal auftreten (Kokalisation). Neuromodulatoren sind allein oder zusammen mit klassischen Transmittern an der Erregungsübertragung im zentralen oder peripheren Nervensystem beteiligt. Neuropeptide spielen z.B. eine Rolle bei der Nozizeption, Stressmechanismen, kardiovaskulärer Regulation, Atemregulation und Hustenreflex, Temperaturkontrolle, Sexualverhalten, Hunger-Sättigung-Regulation (z.B. Tachykinine), Gedächtnisbildung und sind an der neuroendokrinen Steuerung beteiligt [Zilles & Rehkämper (b), 1994].

Neuropeptide werden auch von Zellen des Immunsystems und anderen Zelltypen exprimiert. Interaktionen der Neuropeptide mit dem Immunsystem umfassen:

- a) Verstärkung und Suppression der Antikörperproduktion
- b) Verstärkung und Suppression der Proliferation und Zytotoxizität von Lymphozyten
- c) Modulation der Produktion und Funktion von Zytokinen
- d) Initiation von hypersensitiven Ereignissen sowie möglicherweise auch von Immunkomplex- Erkrankungen

- e) Modulation der Funktionen von Makrophagen und Neutrophilen
- f) Verstärkung der Funktionen der primären lymphatischen Organe, z. B. Regeneration des Thymus

Die Produktion und Sekretion der Neuropeptide bzw. Hormone von Leukozyten, ist denen der neuroendokrinen Zellen nur zum Teil ähnlich. Neuropeptide, die von immunkompetenten Zellen freigesetzt werden, übermitteln Informationen zum Nervensystem. Immunkompetente Zellen können sensorische Funktionen übernehmen, indem sie Stimuli erkennen, die das ZNS und PNS nicht erkennen. Diese Stimuli, auch „noncognitive“ Stimuli genannt, können sein: Bakterien, Viren, Tumore und Antigene. Das Erkennen von derartigen „noncognitiven“ Stimuli durch Immunzellen wird in Informationen umgewandelt. Die Informationen werden dann durch Freisetzung von Neuropeptiden, Hormonen und Zytokinen zum Nervensystem weitergeleitet und können dadurch physiologische Veränderungen hervorrufen [Weigent & Blalock, 1994].

Signale von Neuropeptiden werden durch Peptidasen umgewandelt oder terminiert, indem Peptidasen die Neuropeptide durch Spaltung metabolisieren. In der Mehrzahl gibt es keine spezifischen Neuropeptidasen. Es gibt ungefähr ein Dutzend verschiedener Peptidasen, die an der Zelloberfläche vieler verschiedener Zellen lokalisiert sind. Da die meisten Peptidasen durch das C- bzw. N- terminale Ende blockiert werden, muss zunächst eine Endopeptidase wirken, z.B. Endopeptidase 24.11. (auch Neutralendopeptidase (NEP) genannt), bevor durch weitere Spaltungen von Exopeptidasen, z.B. Aminopeptidasen oder Carboxypeptidasen, die Fragmentierungen vervollständigt werden können. Beinahe alle Peptidasen sind Metallenzyme mit einem katalytischem Zink-Ion. Eine Ausnahme bildet z.B. die Dipeptidylaminopeptidase IV (DPPIV), die eine Serin-Peptidase ist [Turner et al., 1994].

SP ist ein gutes Substrat für NEP. Durch NEP-Hydrolyse aus SP₁₋₁₁ entstandene Spaltprodukte sind vor allem SP₁₋₇ und SP₁₋₈. Durch NEP wird auch humanes CGRP₁₋₃₇ zwischen Leucin (17) und Serin (18) gespalten. SP wird des Weiteren von DPPIV und anderen Carboxy und Aminopeptidasen gespalten [Nyberg et al., 1988; Turner et al., 1994].

1.7.1. Tachykinin - Substanz P (SP)

Tachykinine sind kleine Neurotransmitter-Peptide, deren gemeinsames Merkmal die Aminosäuresequenz am Carboxy-terminalen Ende ist. Die drei hauptsächlichen Tachykinine sind SP, Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB). SP leitet sich durch alternatives

Spießen von dem Vorläufer-Gen Preprotachykinin A (PPTA) ab, das für SP, NKA, Neuropeptide K und Neuropeptide γ codiert. [Nawa et al., 1983, 1984; Kotani et al., 1986]. SP besteht aus 11 Aminosäuren [Chang et al., 1971] und wurde als erstes Peptid der Tachykinin-Familie 1931 von v. Euler und Gaddum entdeckt [von Euler & Gaddum, 1931].

SP-artige Immunreaktivität ist weit verbreitet, wobei sich der hauptsächliche Anteil von SP neben CGRP in den sensiblen C-Fasern des ZNS und PNS sowie im Gastrointestinaltrakt (GIT) befindet [Hua et al., 1985; Lundberg & Saria, 1987]. SP konnte aber auch in nicht-neuronalen Gewebe nachgewiesen werden, so z.B. in Endothelzellen [Loesch et al., 1993; Stones et al., 1995; Cioni et al., 1998] und in Eosinophilen [Metwali et al., 1994].

Tachykinine agieren mit Neurokin-Rezeptoren (NK1, NK2 und NK3) wobei SP die stärkste Affinität zum NK1-Rezeptor besitzt [Maggi et al., 1993]. Die Rezeptoren gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten, metabotropen Rezeptoren [Lee et al., 1983; Lubernarod et al., 1990]. NK1-Rezeptoren sind vor allem im ZNS (Striatum, Rückenmark) sowie in peripheren Organen (GIT; Urogenitaltrakt (UGT)) gefunden worden [Mantyh et al., 1989].

Hier sollen nur einige wichtige Eigenschaften von SP genannt sein. Im ZNS hat SP eine neuromodulatorische Rolle: es übt seine Funktionen durch Reduktion der Repolarisationsphase im Aktionspotential aus, das zu einer erleichterten Depolarisation der neuronalen Membranen führt [Minota et al., 1981; Stanfield et al., 1985]. Als Neurotransmitter hat SP neben nozizeptorischen Funktionen auch barorezeptive und chemorezeptive Funktionen [von Euler & Pernow, 1954; Chen et al., 1990; Nagashima et al., 1989].

SP wird durch mechanische, chemische, entzündliche sowie exzitatorische Reize aus den Nervenendigungen freigesetzt und vermittelt über sensible Fasern die Schmerzleitung. Völlige Entleerung von SP aus sensiblen Nervenfasern durch Capsaisin (Extrakt des rotes Chili) führt zum Fehlen einer spezifischen Schmerzantwort. SP löst direkt eine lokale Entzündungsreaktion mit Plasmaextravasation (auch neurogene Inflammation genannt) aus und führt durch Freisetzung von Histamin aus Mastzellen zu Vasodilatation mit Rubor [Maggi & Meli, 1987; Holzer 1988, 1991; Goetzl et al., 1985].

Während experimenteller Pneumokokken-Meningitis der Ratte kommt es zur Vasodilatation der Pialarteriolen. SP ist vermutlich Mitverursacher der Vasodilatation, da diese signifikant bis zu 3 h nach der Infektion durch Vorbehandlung mit Spantide (einem SP Antagonisten) verringert werden konnte [Pfister et al., 1995]. In einem Maus *Trypanosoma brucei brucei*

Meningoencephalitis-Modell konnten durch Gabe eines spezifischen NK1-Antagonisten die pathologischen Läsionen im Gehirn signifikant verringert werden [Kennedy et al., 1997]. SP scheint eine wichtige Rolle bei der chronischen Entzündungsreaktion zu spielen. So z.B. ist die Dichte der NK-Rezeptoren in Glianarben des ZNS bei Multipler Sklerose gegenüber gesundem Gewebe um das 1000-2000-fache erhöht [Mantyh, 1991].

Durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen u.a. ICAM-1 kann SP dosisabhängig die Adhäsion von Leukozyten an Epithelzellen induzieren [DeRose et al., 1994]. Es stimuliert die Sekretion von TNF- α , IL-1 und IL-6 aus peripheren Monozyten [Lotz et al., 1988] und verstärkt in LPS-stimulierten Astrozytenkulturen die TNF- α -Freisetzung [Luber-Narod et al., 1994]. Außerdem kann SP direkt die IL-1-Freisetzung aus Astrozyten bewirken [Martin et al., 1992].

Die Funktionen der N-terminalen SP-Fragmente, wie z.B. SP₁₋₄ und SP₁₋₇, unterscheiden sich von denen der C-terminalen SP-Fragmente. So spielen N-terminale Fragmente eine verantwortliche Rolle bei der Entzündungsreaktion (Freisetzung von Mediatoren [Goetzel et al., 1985]) und bei der Inhibition der Concanavalin-A-(Con-A)-induzierten Immunantwort [Werner et al., 1987]. Darüber hinaus sind nur N-terminale Fragmente (SP₁₋₄ und SP₁₋₇) fähig, die Sekretion von Lymphokinen mit chemotaktischen Eigenschaften für Granulozyten und Lymphozyten zu induzieren [Paegelow et al., 1989].

SP₁₋₇ und SP₁₋₁₁ besitzen viele Gemeinsamkeiten, aber auch einige Unterschiede bezüglich biologischer Eigenschaften und Änderungen des Verhaltensmusters. So führen sie z.B. bei der Ratte durch intrazerebroventrikuläre Injektion gemeinsam zur Analgesie, barorezeptiven Hypotension und Hemmung des provozierten, aggressiven Verhaltens, während das Pflegeverhalten durch SP₁₋₁₁ verstärkt und durch SP₁₋₇ gehemmt wird [Nyberg et al., 1988].

1.7.2. Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

CGRP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid. Es entsteht durch alternatives Spleißen der RNA von dem Calcitonin/ α -CGRP Gen [Rosenfeld et al., 1981, 1983; Amara et al., 1982]. Neben der α -CGRP Form gibt es auch eine β -CGRP Form. Für beide Formen befinden sich die Gene auf dem Chromosom 11. Sie unterscheiden sich je nach Spezies zwischen 1 und 3 Aminosäuren, besitzen aber ähnliche biologische Eigenschaften [Amara et al., 1985; Steenbergh et al., 1984, 1985; Wimalawansa, 1990].

CGRP ist im ZNS, sowie im PNS, weit verbreitet. Besonders stark konzentriert sich CGRP in den Perikarya des *Ganglion trigeminale*, in den Axonen der C- und A δ -Fasern, sowie in den Hirnnervenkernen [van Rossum et al., 1997; Gibson et al., 1984; Levine et al., 1993; Unger et al., 1991].

CGRP übt seine Wirkung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus. Bisher wurden die Rezeptoren CGRP-1 und CGRP-2 klassifiziert. Sie unterscheiden sich in der Affinität und biologischen Aktivität des CGRP-Fragmentes (CGRP₈₋₃₇) am Rezeptor. So hat CGRP₈₋₃₇ starke antagonistische Eigenschaften mit höherer Affinität zum CGRP-1-Rezeptor als zum CGRP-2-Rezeptor [van Rossum et al., 1997]. Bislang wurde nur der CGRP-1-Rezeptor kloniert. Auf zwei verschiedenen Genen ist der pharmakologisch definierte CGRP-1-Rezeptor verschlüsselt. Aiyar et al. klonierte den CGRP-1-Rezeptor, der auch als „Calcitonin receptor-like receptor“ (CRLR) Rezeptor bezeichnet wird. Kapas & Clark bestimmten den CGRP-1 Rezeptor, welcher auch RDC-1-Rezeptor genannt wird [Aiyar et al. 1996; Chang et al., 1993; Flühman et al., 1995; Kapas & Clark, 1995]. Später wurde gezeigt, dass der CRLR-Rezeptor als CGRP- oder AM-Rezeptor funktionieren kann. Abhängig von sogenannten „receptor-activity-modifying proteins“ (RAMPs). Diese RAMP's sind erforderlich für den Transport des CRLR-Rezeptor zur Plasmamembran. Dabei präsentiert sich der CRLR-Rezeptor mit RAMP-1 als CGRP-Rezeptor und mit RAMP-2 als AM-Rezeptor an der Zelloberfläche [McLatchie et al., 1998].

Derzeit ist die physiologische Rolle und die Lokalisierung der Rezeptoren noch weit gehend unbekannt. Im Trigeminovaskulären System wurden bisher keine regulären präsynaptischen CGRP-Rezeptoren nachgewiesen, jedoch konnte kürzlich mRNA für CRLR-, RDC1- und AM- Rezeptoren in humanen *Ganglia trigeminale* bestimmt werden [Moreno et al., 1999].

CGRP ist in viele Mechanismen involviert. An dieser Stelle sollen nur einige Eigenschaften genannt sein:

CGRP wirkt als starker, lang anhaltender peripherer und zerebraler Vasodilatator durch Akkumulation von cAMP [Brain et al., 1985; Edwards et al., 1991]. Intravenös verabreicht, löst CGRP eine Tachykardie mit begleitendem Blutdruck-Abfall [Sigrist et al., 1986] aus, während andererseits das Fehlen des α -CGRP Gens zu signifikant höheren systolischen Blutdruckwerten führt [Gangula et al., 2000]. Des Weiteren spielt CGRP eine Rolle bei der Hunger-Sättigungs-Regulation sowie bei der Regulation von Hormonen der Thalamus-Hypophysen-Achse [Molina et al., 1990; Tannenbaum et al., 1985].

In den meisten Entzündungsmechanismen wirkt CGRP verstärkend, zeigt aber kaum eigenverursachte Entzündungsreaktionen. Hierzu sollen nur einige Beispiele genannt sein: CGRP verstärkt dosisabhängig die IL-1 induzierte NO-Synthese (iNOS) sowie die Produktion von glatten Muskelzellen der Aorta (SMC), während bei alleiniger Stimulation mit CGRP keine wesentliche iNOS-Synthese stattfindet [Schini-Kerth et al., 1994]. Es moduliert die inflammatorische Ödembildung in der Haut von Ratten, indem es in synergistischer Art und Weise die permeable Wirkung von SP verstärkt [Newbold & Brain, 1993], während CGRP allein nur einen geringen Effekt auf die Gefäß-Permeabilität hat [Brain & Williams, 1985]. Es ist befähigt, die IL-1 β und C5a induzierte Akkumulation von Neutrophilen [Buckley et al., 1991 a, b], sowie die IL-6 Freisetzung durch LPS Stimulation bei Mausmakrophagen via cAMP [Tang et al., 1998] zu potenzieren. In einem bakteriellen Meningitis Modell konnte die Endotoxin-verursachte Vasodilatation der Pial-Arteriolen teilweise durch Gabe von CGRP₈₋₃₇ gehemmt werden [Brain Jr. et al., 1995].

1.7.3. Adrenomedullin (AM)

Adrenomedullin (AM) ist ein aus 52 Aminosäuren bestehendes Peptid, das erst 1993 aus humanen Phäochromozytomgewebe isoliert wurde. Bioaktives AM entsteht aus den Vorstufen Preproadrenomedullin (185 AS) und Proadrenomedullin (164 AS). Das Gen für AM ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert. AM gehört zur CGRP/Calcitonin-Peptid-Familie und besitzt eine 27 %ige homologe Aminosäuresequenz mit CGRP [Kitamura et al., 1993]. Beides, AM-mRNA und Peptid, wird hauptsächlich von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten konstitutiv gebildet [Isumi et al., 1998 a, b; Sugo et al., 1994 a, b]. AM ist aber auch im Gehirn [Serrano, et al., 2000; Takahashi et al., 2000], in peripheren Organen, sowie im Blutkreislauf weit verbreitet [van Rossum et al., 1997].

Spezifische AM-Rezeptorbindungsstellen (AM-R) mit hoher Dichte sind in der Ratte zu finden [Owji et al., 1995]. Obwohl ein spezifischer AM-R (Auch L1 Rezeptor genannt) kloniert und sequenziert wurde [Kapas et al., 1995; Hänze et al., 1997], haben pharmakologische Untersuchungen gezeigt, dass die vasomotorische Aktivität von AM meist über den CGRP-1-Rezeptor induziert wird. Passend dazu war die mRNA des CRLR-Rezeptors in allen Zellen der zerebralen Blutgefäße und Astrozyten stark exprimiert, während mRNA des L1-Rezeptors nur schwach in humanen zerebralen Kapillaren und Astrozyten exprimiert wurde [Moreno et al., 1999]. Vaskuläre CGRP-1-Rezeptoren können AM mit ähnlicher [Baskaya et al., 1995] oder leicht geringfügiger [Nuki et al., 1993] Affinität binden

wie CGRP. Diese Annahme wird unterstützt durch den Nachweis von CRLR-Rezeptor- und RAMP-1,-2,-3-mRNA an humanen meningialen-, zerebralen- und temporalen Arterien [Sams & Jansen-Olesen, 1998]. Eine japanische Arbeitsgruppe behauptet sogar, dass an humanen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nur CRLR und RAMP-2 exprimiert werden [Kamitani et al., 1999]. (siehe auch unter Abschnitt 1.7.2.)

Nachfolgend sollen wiederum nur einige Eigenschaften von AM genannt sein. AM ist wie CGRP ein sehr potenter, lang anhaltender Vasodilatator der zerebralen Arterien, zerebralen Arteriolen [Baskaya et al., 1995; Mori et al., 1997] und peripheren Blutgefäße [Jougasaki & Burnett, Review, 2000]. Systemische Applikationen von AM führen zur Reduktion des systemischen Gefäßwiderstandes mit daraus folgender Hypotension. Im Gegensatz dazu führen intrazerebroventrikuläre Injektionen zur systemischen Hypertension [Takahashi et al., 1994; Samson et al., 1998]. AM besitzt noch viele andere Eigenschaften in Zusammenhang mit Lunge, Niere und Herz (chronische Herzerkrankungen, Myokardinfarkt) und hat Einfluss auf das endokrinologische System.

AM übt sein Signal überwiegend über den G-Protein-gekoppelten cAMP (einen „second messenger“) aus, aber auch über den G-Protein-gekoppelten Phosphoinositol-Mechanismus [Shimekake et al., 1995].

Die Rolle von AM im Entzündungsprozess ist noch weit gehend unbekannt. Die AM-Werte im Plasma von Patienten mit Pankreatitis, Trauma, Verbrennungen, traumatischem Schock, schwerer Sepsis und septischem Schock sind gegenüber der Kontrollgruppe um das 20-fache erhöht. Dabei bestand eine Korrelation zwischen dem AM-Plasmawert und der Schwere der Klinik. Außerdem korrelierten die AM-Werte signifikant mit den TNF α -Werten im Plasma [Ueda et al., 1999].

TNF- α , IL-1, LPS und z. T. IFN- γ stimulieren die AM-Synthese und -Sekretion von glatten Muskelzellen, Endothelzellen der Aorta, Fibroblasten, Makrophagen [Sugo et al. 1994b, 1995; Isumi et al., 1998 a, b; Kubo et al., 1998] und in kultivierten Astrozyten [Takahashi et al., 2000]. Im Gegensatz dazu ist AM in der Lage, innerhalb 1 h sowohl die TNF- α -mRNA-Expression in kultivierten Fibroblasten zu supprimieren [Isumi et al., 1999] als auch die TNF- α - und IL-6-Sekretion von LPS-stimulierten Makrophagen zu hemmen [Kubo et al., 1998]. Einen verstärkenden Effekt zeigt AM auf die iNOS-Expression bei Zytokin-stimulierten Kardiomyozyten [Ikeda et al., 1996].

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass bei fokaler Ischämie des Gehirns die AM-mRNA-Expression bis auf das 21-fache im Kortex der Ratte erhöht ist. Immunhistochemische Untersuchungen ergaben AM-ähnliche Immunreaktivität. Die Immunreaktivität war kolokalisiert mit Intermediärfilamenten der Neurone, sodass vermutlich das Peptid aus den geschädigten Nervenfasern freigesetzt worden ist. Dagegen fand sich außerhalb des Ischämie-Gebietes keine Immunreaktivität von AM [Wang et al., 1995].

1.8. Hypothesen

Hypothesen der Dissertation sind:

1. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Substanz P (SP) beeinflussen die von Zellwänden von *S. pneumoniae* (PCW) induzierte TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 mRNA-Expression und Freisetzung in kultivierten zerebralen Kapillarendothelzellen.
2. Pneumokokkenzellwände (PCW) regulieren die mRNA-Expression von Calcitonin-Receptor-Like Receptor (CRLR) im zeitlichen Verlauf.
3. Zerebrale Endothelzellen exprimieren und setzen Adrenomedullin (AM) frei.
4. PCW-Stimulation der zerebralen Endothelzellen verstärkt die Expression von AM.
5. CGRP und AM beeinflussen sich gegenseitig durch die Regulation des „Calcitonin Receptor-Like Receptor“ (CRLR) Rezeptors.

2.0. Material und Methoden

2.1. Zellkulturen

Alle Zellkulturmedien, fötales Kälberserum (FKS), Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ als Standardpuffer, sowie sonstige Zusatzlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Biochrom KG, Berlin bezogen. Kollagenase/Dispase, Desoxyribonuclease (DNAse) E.C.3.1.21.1. und Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF) wurden von Böhlinger/Mannheim, Kollagenase und Rinderserumalbumin (BSA) von SERVA, Heidelberg bezogen.

Die Primärkulturen wurden von Wistar-Ratten, die von Charles River, Deutschland geliefert worden, gewonnen. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit Narkoseether der Hoechst AG, Frankfurt/Main.

Die für die Zellkulturen verwendeten sterilen Plastikartikel waren von Falcon, der Firma Becton Dickinson, Heidelberg oder der Nunc GmbH, Wiesbaden.

2.1.1. Primärkulturen der zerebralen Kapillarendothelzellen

Die Präparation der zerebralen Endothelzellen wurde wie von Freyer et al. [1999] beschrieben durchgeführt.

Die Präparation der zerebralen Kapillarendothelzellen erfolgte von 3 Wochen alten Wistar-Ratten nach modifizierten Methoden von Bowman et al.[1981] und Abbott et al. [1992]. Nach dem Entfernen der Meningen und oberflächlichen Blutgefäße von den Kortizes, erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Hemisphären. Das Homogenat wurde in DMEM mit 1,1 U/ml Kollagenase aufgenommen und bei 37 °C für 1 h inkubiert und anschließend mit kalter 25 %iger BSA Lösung 1:1 aufgefüllt und bei 2800 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM mit 0,1 % Kollagenase/Dispase resuspendiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 1800 rpm, wurde das Pellet in DMEM mit 0,05 % DNAse resuspendiert und für 1 min inkubiert. Nach dem Waschen mit DMEM wurde die Zellsuspension in Wachstumsmedium (DMEM mit 20 % FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 1,2 mM N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin; 100 U/l Heparin; 20 mg/l Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF); 110mg/l Natrium-Pyruvat (Sigma, St. Louis, MO) und L-Valin ersetzt durch D-Valin zur Unterdrückung der Astrozytenproliferation [Abbott et al., 1992] aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in

Kollagen-G-beschichteten Zellkulturplatten (mit 24 Vertiefungen) ausgesät.

Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 6-8 Tagen bildeten die Kulturen einen konfluenten Monolayer und wurden für die Experimente verwendet.

2.1.2. Die Zell-Linie L929

Für die Durchführung des Bioassays zur Bestimmung des freien TNF- α war die routinemäßige Haltung der murinen Fibroblasten-Zell-Linie L929, die durch Dr. Scholz von der Schering AG Berlin uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, notwendig.

Die Zellen wurden in 275 cm² Kulturflaschen mit 45-50 ml Medium kultiviert. Das Wachstumsmedium hatte folgende Zusammensetzung:

RPMI 1640 (Kat. Nr. F1215) mit

- 5 % FKS
- Penicillin / Streptomycin (100 E /100 μ g/ml)
- 2 mM L-Glutamin

Die Zellen wurden 2-mal pro Woche mit einer Trypsin/ EDTA -Lösung passagiert.

2.2. Die Stimulation der Zellkulturen

2.2.1. Materialien

Zellwände von *S. pneumoniae* (PCW)

Die PCW wurden von Dr. W. Bürger, sowie später von Dr. R. Schumann im Institut für Mikrobiologie der Charité, nach einer modifizierten Methode von Tuomanen et al. [1985] präpariert und uns als Suspension in pyrogenfreier NaCl-Lösung zur Verfügung gestellt. Die Modifikation erfolgte nach Weber et al. [1995].

Bakterien eines unbekapselten Stammes (PnR-527, Jena) von *S. pneum.* wurden über Nacht auf Columbia Agar Platten kultiviert, anschließend in pyrogenfreier NaCl-Lösung suspendiert und bei 100 °C für 20 min inaktiviert. Die inaktivierten Bakterien wurden durch eine Ultraschallbehandlung (2 x 7 min/150 W) desintegriert. Nach mehreren Waschschrinen wurde die Suspension auf eine optische Dichte von 0,66 bei 620 nm eingestellt, die mit 10⁷ colony forming units (cfu)/ml korreliert. Deshalb erfolgen alle Konzentrationsangaben für die PCW in cfu/ml. Die Suspension mit einem pH-Wert von 7,4 enthielt weniger als 1 % intakte Zellen,

weist keine nachweisbaren Konzentrationen von DNA/RNA ($< 0,1$ ng/ml) und Protein (<1 μ g/ml) auf.

Medium

Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte in serumfreien VLE RPMI 1640 Medium (Biochrom KG), dem Penicillin/Streptomycin (100 E/ 100 μ g/ml) zugesetzt wurde.

Die folgenden Peptide wurden alle von Sigma St. Louis, MO bezogen. Der SP Antagonist SR140333 wurde uns freundlicherweise von Monsieur Xavier Emonds-Alt von Sanofi Recherche in Montpellier/ Frankreich zur Verfügung gestellt.

Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) rat 1-37

Ratten Synthetisches CGRP wurde in einer 10 μ M Stammlösung in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Braun, Melsungen) angesetzt und in Aliquots zu je 50 μ l bei -20 °C gelagert.

Calcitonin- Gene- Related Peptide Fragment 8-37 (CGRP₈₋₃₇)

Human Synthetisches CGRP₈₋₃₇ wurde in einer 100 μ M Stammlösung in 0,9 %iger NaCl-Lösung angesetzt und in Aliquots zu je 100 μ l bei -20 °C gelagert.

Substanz P (SP)

Synthetisches SP wurde in einer 1 mM Stammlösung in 0,9 %iger NaCl-Lösung angesetzt und in Aliquots zu je 50 μ l bei -20 °C gelagert.

Substanz P Fragment 1-4

Synthetisches SP Fragment 1-4 wurde in einer 2 mM Stammlösung in 0,9 %iger NaCl-Lösung angesetzt und in Aliquots zu je 50 μ l bei -20 °C gelagert. In den Experimenten wurden Endkonzentrationen von 200 nM und 2000 nM eingesetzt.

SR140333

Eine 1 mM Stammlösung wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO)(Sigma) gelöst und in Aliquots zu je 100 μ l bei -20 °C gelagert.

Für alle genannten Peptide wurden die eingesetzten Endkonzentrationen jeweils vor Beginn der Experimente frisch angesetzt.

2.2.2. Durchführung der Stimulation

Für die Durchführung der Experimente erfolgte die Stimulation der zerebralen Endothelzellen in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen.

Nach dem Entfernen des Wachstumsmediums wurden 400 µl serumfreies RPMI 1640 aufgetragen und, wenn nicht anders angegeben, das Standardvolumen von 20 µl PCW, das entspricht 5×10^5 lebenden Pneumokokken/ml bzw. 500×10^3 cfu/ml, zugesetzt; für die Zellkontrollen jeweils weitere 20 µl des serumfreien RPMI Medium. Bei allen durchgeführten Experimenten wurden jeweils 1-2 Proben mit der Standardkonzentration PCW als Positivkontrolle und 1-2 Proben als Negativkontrolle mitgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Inkubator mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Zusätzliche Stimulanzien wie CGRP, SP, SP₁₋₄, sowie die Antagonisten CGRP₈₋₃₇ und SR140333 - in ihren verschiedenen angegebenen Konzentrationen - wurden gleichzeitig mit PCW und dem Kontrollmedium zugegeben.

Für die RNA-Isolation wurden die stimulierten Zellen nach 4 h geerntet, wenn nicht anders angegeben.

Zur Untersuchung der Freisetzung von TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 und MIP-2 wurden die Überstände der stimulierten Zellen nach 4 h und 8 h und für die Bestimmung von AM(1-50) zusätzlich nach 0 h und 12 h abgenommen und bis zur Messung bei -70 °C aufbewahrt.

2.3. RNA Isolation

2.3.1. Materialien

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNaïd® Plus Kit (Bio 101, dianova, Hamburg)

Die RNA-Extraktion wurde modifiziert nach Chomczynski & Sacchi [1987] unter Verwendung von Lösungen des Kits (wenn Firma nicht anders angegeben).

Folgende Lösungen und Substanzen des Kits (Bio 101) wurden verwendet:

- Zellysislösung (Lösung enthält Guanidin Thiocyanat)
- Phenol Puffer 30ml

Der Puffer wurde nach Angaben des Herstellers mit flüssigen Phenol (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) ad 100 ml aufgefüllt und als gebrauchsfertiges Phenolsäuregemisch bei 4 °C gelagert.

- RNAMATRIX®
- RNA-Waschkonzentrat

Diese Lösung wurde mit absolutem Ethanol (Merck, Darmstadt) nach Anweisung des Herstellers zu einer Gebrauchswaschlösung verdünnt.

- DEPC-Wasser

Weitere verwendete Materialien:

- Chloroform Isoamylalkohol 24:1 Gemisch (Sigma-Aldrich)
- 2 ml und 0,5 ml Eppendorfröhrchen (Eppendorf, Hamburg)
- Spin-X 22CA Centrifuge Tube Filter (Corning Costar Co., Deutschland)

2.3.2. Durchführung der RNA-Isolation

Bei allen Arbeitsschritten wurde darauf geachtet, dass möglichst wenig RNase-Kontamination auftritt. Maßnahmen waren: das Tragen von neuen puderfreien Handschuhen (Hartmann, Heidenheim), sterile Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg), gesonderte RNA-Pipetten (Eppendorf), schnelles Überführen der Proben in flüssigen Stickstoff vor Lagerung bei -70 °C.

Die RNA-Isolation wurde wie folgt durchgeführt:

1. Zellernte

Nach dem Abnehmen der Überstände von den stimulierten Zellen und der Lagerung der Überstände für spätere Proteinbestimmungen bei -70 °C, erfolgte die Zugabe von 800 µl Zelllysislösung je Vertiefung der Zellkulturplatte. Die lysierten Zellen wurden gut resuspendiert und das komplette Volumen in 2 ml-Röhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bis zur RNA Isolation bei -70 °C gelagert.

2. RNA-Isolation

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und gut durchmischt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Phenolsäuregemisch im Verhältnis 1:1 zum Probenvolumen (800 µl) und die Zugabe von 400µl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 (50 % des Phenolsäuregemisch-volumen).

Alles wurde gut durchmischt bis das Probengemisch homogen weißlich trüb war und für 10 min auf Eis gelagert wurde.

Es folgte das Zentrifugieren der Proben in vorgekühlter Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) bei 4 °C und 14000 rpm für 20 min. (Durch die Zentrifugation setzten sich am Boden in der Chloroform- und Phenolphase die Proteine und Lipide etc. ab. Die Interphase enthielt leichte Proteine und DNA und in der Oberphase befand sich die RNA.)

Während der Zentrifugation wurde die RNAMATRIX[®] gut durchmischt und jeweils 10 µl in neue 0,5 ml-Röhrchen überführt.

3. RNA Bindung an RNA Matrix

Von der oberen Phase wurden vorsichtig $\frac{3}{4}$ ca. 600 µl abpipettiert, in die vorbereiteten RNA-Matrix-Röhrchen überführt, gut durchmischt - bis die Suspension homogen erschien. Die Proben wurden bei RT für 10 min stehen gelassen und zwischenzeitlich alle 2 min mit der Mikrozentrifuge (Fisher Scientific, Co.) anzentrifugiert, danach wiederholt bei 8000 rpm für 30 sec zentrifugiert und die Überstände dekantiert.

4. RNA- Reinigung

Die Reinigung der RNA erfolgte durch Zugabe von je 100 µl RNA-Waschgebrauchslösung zur Probe. Die Probe wurde solange durchmischt, bis sich das Pellet homogen in der Waschlösung verteilte. Wiederholt wurde bei 8000 rpm für 30 sec zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wurde insgesamt 3-mal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde der Überstand mit der Pipette gründlich abgezogen und die Proben mit offenem Deckel für ca. 45 min stehen gelassen, damit sich der Alkohol verflüchtigen und das RNA-Pellet trocknen konnte.

5. RNA von Matrix lösen

Auf das getrocknete Pellet wurden 10 µl DEPC-Wasser (RNAse Inhibitor) zugegeben und die Suspension gut durchmischt, bis sie homogen weißlich trüb war. Die Suspension wurde bei 55 °C auf vorgeheizten Thermal-Cycler (Perkin Elmer Cetus, USA) für 10 min inkubiert. Während der Inkubation wurden SpinX-Spezialfiltrerröhrchen mit 2 µl DEPC-Wasser benetzt und auf Eis gestellt.

Nach der Inkubation wurden die Proben bei 10000 rpm und RT für 2 min in Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette in vorbereitete

SpinX-Spezialfiltrerröhrchen überführt, bei 3000 rpm für 2 min in der Mikrozentrifuge anzentrifugiert und danach auf Eis gestellt.

Um die Ausbeute an RNA zu erhöhen, wurde der Vorgang (5.) wiederholt.

6. Abschlusszentrifugation

Abschließend wurden die SpinX-Spezialfiltrerröhrchen, bei 5000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, die Filter entnommen. Die RNA wurde entweder bei -70 °C gelagert oder gleich für die cDNA-Synthese genutzt.

7. Überprüfung der RNA-Extraktion durch Agarose Gel Elektrophorese

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe eines 1 %igen Agarosegels überprüft. Das Agarosegel wurde wie folgt mit 1 x TBE-Puffer (Rezeptur des TBE-Puffers siehe Auswertung) hergestellt:

- a) Pro 100 ml Agarose (Sigma) wurden 5 µg Ethidiumbromid (Sigma) zugegeben.
- b) Das Gel wurde handwarm in die Gelkassetten, die zuvor mit DEPC-Wasser ausgewaschen wurden, gegossen und trocken gelassen.
- c) 2 µl RNA-Probe wurden mit 3 µl Ficoll (Sigma) und 10 µl H₂O gemischt und jeweils in die Probestaschen aufgetragen. Zusätzlich wurde eine 100 bp DNA Leiter 1,0 µg/µl (GIBCOBRL, Deutschland) mitgeführt.
- d) Das Gel wurde bei 70 V für 40 min in einer 150 ml-Gelkassette mit 1 x TBE-Puffer gefüllt und laufen gelassen.
- e) Die Auswertung der rRNA erfolgte mit dem UV-Transilluminationssystem (Fisher Scientific) und wurde mit einer Sony-Kamera fotografisch dokumentiert.

Fotometrische Messung der RNA

In Vorbereitung auf die cDNA-Synthese wurde der Gehalt an RNA gemessen. Für diesen Zweck wurden die RNA Proben 1:40 verdünnt und am Fotometer bei 260 nm gemessen.

Der Gesamt RNA Gehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x \text{ µg RNA/µl} = \text{OD } 260\text{nm} * 40 \text{ (Verdünnungsfaktor)} * 0,04 \text{ (RNA Faktor)}$$

Anschließend wurde die RNA für die cDNA-Herstellung auf eine Konzentration von 0,5 µg eingestellt.

2.4. Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgte in modifizierter Form nach Murphy et al. [1993].

2.4.1. Materialien

Folgende Lösungen wurden verwendet und bei -20 °C gelagert:

1. 5 x First Strand Buffer
2. „Moloney- Murine Leukemia Virus Reverse Trankriptase“ (M-MLV RT) 200 U/ μl
3. DTT 1 mM
4. dNTP Mix 10 mM
5. RNasin® Ribonuklease Inhibitor 2500 Units (Promega, Deutschland)
6. pd(T)₁₂₋₁₈ OligoDT Primer (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)
7. destilliertes Wasser, pyrogenfrei (Braun, Melsungen)

(Substanzen 1-4 wurden von GIBCOBRL, Deutschland bezogen.)

2.4.2. Durchführung

Die RNA wurde in 0,5 ml-Eppendorfröhrchen überführt, bei 85 °C für 5 min im Thermal-Cycler erhitzt (DEPC sollte verdampfen, da es die Reverse-Transkriptase hemmt) und anschließend auf Eis gestellt.

In der Zwischenzeit wurde der Gesamtmix hergestellt. Pro Probe wurde ein 40 μl Ansatz angesetzt. Zur Herstellung des Ansatzes siehe Tab. Nr.1, 3. Spalte. Der Mix wurde in jede RNA-Probe (0,5 μg) pipettiert und mit destilliertem H₂O ad 40 μl aufgefüllt. (Mit dem Volumen des destilliertem H₂O musste ggf. variiert werden.)

Tab. 1: Gesamtmix für cDNA-Synthese

• Reagenzien	• -RT Ansatz in μl (20 μl Mix/ 0,5 μg RNA)	• +RT Ansatz in μl (40 μl Mix/ 0,5 μg RNA)
• 5x First Strand Buffer	• 4	• 8
• dNTP (10mM)	• 2	• 4
• RNasin®2500U	• 0,5	• 1
• pd(T) ₁₂₋₁₈ Primer 0,2mg/ml	• 1	• 2
• M-MLVRT (200 U/ μl)	• -	• 2
• DTT (1mM)	• 0,5	• 1
• destilliertes H ₂ O	• 9,5	• ad 40

Das cDNA-Synthese-Gemisch wurde gut gemischt und im Thermal-Cycler bei 21 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurde gleich mit Hilfe der Programmeinstellung am Thermal-Cycler die Reverse-Transkription bei 42 °C für 45 min und bei 99 °C für 5 min durchgeführt. Nach Abschluss der cDNA-Synthese wurden die Proben kurz zentrifugiert und bis zur Durchführung der RT-PCR bei -20 °C gelagert.

Als Negativkontrollen in der PCR dienten die Minus-Reverse Transkription (-RT).

Der Ansatz erfolgte wie bei der cDNA Synthese, jedoch wurde im Gesamtmix die M-MLVRT durch destilliertes H₂O ersetzt. Für diese Proben wurden 0,5 μg RNA in einem 20 μl Ansatz (Tab.1, Spalte 2) pro Probe eingesetzt.

2.5. Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Die semiquantitative RT-PCR erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Siegling et al. [1994]. Von Prof. Volk (Immunologie der Charité) wurde uns freundlicherweise das rattenspezifische Kontrollfragment (KF), welches u.a. Standard DNA für β -Actin, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α sowie MIP-2 enthält, zur Verfügung gestellt.

2.5.1. Materialien

1. Folgende Materialien wurden für sämtliche PCR genutzt, wenn nicht anders angegeben.
2. Thermal-Cycler (Perkin Elmer Cetus, 1992)
3. 0,5 ml-Eppendorfröhrchen
4. Pipetten und Pipettenspitzen (Eppendorf)
5. AmpliTaq® DNA Polymerase (5 Units/ μ l); 10 x PCR Puffer II; $MgCl_2$ 25 mM (Perkin Elmer, Deutschland)
6. 10 mM Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) (Diese Stammlösung wurde aus einem dNTP Satz 100 mM [dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25 mM] von Pharmacia, Deutschland hergestellt und in 100 μ l Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.)
7. Sense Primer und die mit Cy-Thiolation am 5'-Ende markierten Antisense Primer (Pharmacia)
8. destilliertes Wasser (pyrogenfrei) (Braun) als Verdünnungsflüssigkeit
9. Mineralöl für Molekularbiologie (Perkin Elmer)

2.5.2. Semiquantitative β -Actin PCR

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese und zur Einstellung eines gleichen cDNA-Eingangsvolumen der Proben in der PCR diente die β -Actin PCR. β -Actin wird von einem „Housekeeping gene“ in allen Zellen unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle exprimiert und eignet sich daher cDNA quantitativ zu erfassen. Das rattenspezifische KF enthält β -Actin cDNA mit einer Länge von 601 Basenpaaren (bp). β -Actin der hergestellten cDNA der Proben haben eine Länge von 762 (bp). Das Prinzip der kompetitiven PCR besteht darin, dass β -Actin cDNA (Ziel-DNA) und Standard β -Actin KF (Standard-DNA) um die Primer konkurrieren. Die PCR wurde so oft wiederholt, bis ein Verhältnis von 1:1 zwischen der Ziel-cDNA und der β -Actin-DNA des KF erreicht wurde.

Die β -Actin-PCR wurde wie folgt durchgeführt.

Zuerst wurde 1 μ l cDNA (Probe) in die PCR-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurde 1 μ l aus der KF-Stocklösung (Standard DNA) in Zehnerschritten $1:10^5$ verdünnt und der „Mastermix“ für ein PCR-Gesamtvolumen von 25 μ l/Probe angesetzt. (Für den Ansatz des Mastermixes siehe Tab. 2, Spalte 2.)

Aus dem Mastermix wurden 24 µl pro 1 µl cDNA Probe hinzupipettiert, gut durchmischt sowie 1 Tropfen Öl je Probe hinzugefügt.

Die PCR wurde im Thermal-Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Zuerst findet eine Denaturierung bei 95 °C für 5 min statt. Für die für die folgende PCR-Schleife gilt 1. bei 95 °C für 1 min (Denaturierung) 2. bei 68 °C für 1 min (Anlagerung der Primer); 3. bei 72 °C für 1 min (Verlängerung der Primer). Die PCR-Schleife umfasst 28 Zyklen und abschließend wird die Synthese bei 72 °C für 10 min vervollständigt.

Tab. 2: Mastermix für 25µl PCR Ansatz

Reagenzien für PCR Mastermix	Ansatz je PCR Probe in µl	
	β-Actin PCR	Zytokin PCR
destilliertes Wasser	17,9	17,8
10 x PCR Puffer II	2,5	2,5
MgCl 2,5 mM	1,5	1,5
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) 10mM	1	1
Sense Primer 10µM	0,5	0,5
Cy5 Antisense Primer 10µM	0,5	0,5
[Kontrollfragment] 10 ⁻⁵ (verdünnt 1:10 ⁵)	1	1
Taq Polymerase 5 Units/µl	0,1	0,2

Die Auswertung der PCR Produkte erfolgte wie unter Abschnitt 2.6. beschrieben.

2.5.3. Semiquantitative Zytokin PCR

Nachdem die cDNA auf ein gleiches Eingangsvolumen im Verhältnis 1:1 zum KF eingestellt wurde, erfolgte die Zytokin-PCR (Ansatz siehe Tab. 2, Spalte 3). Die Zytokin-PCR ist in der Durchführung der β-Actin-PCR sehr ähnlich. Sie unterscheidet sich nur durch die konstante Zugabe der jeweils gleichen cDNA-Menge pro Ko-Amplifikation mit dem KF. Für jede Zytokin-PCR wurden mehrere dezimale Verdünnungsstufen des KF eingesetzt. Dabei stellten serielle Verdünnungen des KF sicher, dass die Ko-Amplifikation im linearen Bereich stattfand.

Alle PCR (β-Actin, Zytokin, Rezeptoren usw.) wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Nur die Anlagerungstemperatur (Annealing Temperature) und Zyklenanzahl wurde für die jeweilige PCR und deren Primer optimal eingestellt (siehe Abschnitt 2.5.2.). In den folgenden Tabellen (3 und 4) werden deshalb nur die Annealing Temperature (AT) und die Zyklenanzahl angegeben.

Die Primer wurden nach den von Siegling et al. [1994] beschriebenen Sequenzen (Tab. 3) gewählt und in den jeweiligen PCR eingesetzt.

Mit der semiquantitativen PCR Methode sind TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 bestimmt worden (siehe auch Tab. 3).

Tab.3: Primersequenzen und PCR-Bedingungen

cDNA	Primersequenzen (Siegling et al.,1994)		AT; Zyklen	PCR Produkte in Basenpaaren (bp)	
	Sense Primer 5'→3'	Antisense Primer 5'→3'		Proben cDNA	KF
TNF- α	CGAGTGACAAGCCCGTAGCC	GGATGAACACGCCAGTCGCC	65°C; 38	468	339
IL-1 β	CCAGGATGAGGACCCAAGCA	TCCCGACCATTGCTGTTTCC	60°C; 38	519	379
IL-6	CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT	GAGAGCATTGGAAGTTGGGG	64°C; 40	496	379
IL-10	TGCCTTCAGTCAAGTGAAGACT	AAACTCATTCATGGCCTTGTA	60°C; 40	346	421
MIP-2	CTGGTCCTGCTCCTCTGCT	TTTGATTCTGCCCGTTGAGG	60°C; 38	316	218

2.5.4. PCR ohne kompetitives Kontrollfragment

Für den Nachweis der cDNA der CGRP1-Rezeptoren (CRLR und RDC-1), des Adrenomedullins (AM) und des L-1-Adrenomedullinrezeptors (ADM-R) (siehe auch Abschnitte 1.8.1. und 1.8.3.) wurden keine Ko-Amplifikationen mit einem Kontrollfragment durchgeführt. Die durch β -Actin-PCR eingestellte cDNA-Konzentration wurde in der jeweiligen PCR eingesetzt (siehe auch unter 2.5.2.).

Der PCR-Ansatz erfolgte wie bei der Zytokin-PCR (Tab. 2, Spalte 3), jedoch ohne Zugabe von KF und mit einer höheren Primerkonzentration von 50 μ M (Endkonzentration 1 μ M). Die Sense Primer und Cy5 markierten Antisense Primer sind von der Firma Biosource Europe S.A. (Nievelles, Belgien) synthetisiert worden.

In Tabelle 4 werden für die untersuchten cDNAs Annealing Temperature (AT), Zyklusanzahl, cDNA-Basenpaarenlängen (bp); Primer Sequenzen und Referenzen angegeben. (weitere PCR-Reaktionsbedingungen siehe unter 2.5.2.)

Tab. 4: Primersequenzen und PCR-Bedingungen für PCR ohne KF

cDNA	(AT; Zyklen)	cDNA Länge (bp)	Primersequenzen		Referenzen
			Sense	Cy5 Antisense	
CRLR	(62°C; 40)	501	1299-1320 5'TTACAGCCCATCAG GTAAAGA 3'	1781-1801 5'AGTCATGAGAATGT GCATGA 3'	Chang et al., 1993; Flühmann et al., 1997
RDC-1	(60 °C; 40)	239	839-861 5'GATCATCTTCTCCT ACGTGGTGG 3'	1055-1078 5'AAGATGAAGGCCTTC ATCAGCTCG 3'	Mirtella et al., n.p. Autelitano, 1998
L1 (ADM-R)	(57 °C; 40)	630	771-791 5'ATCCCACTGCCTGA GGTGGTA 3'	1380-1401 5'GGTGAGGTGTTTCGGA GGCAGA 3'	Kapas et al., 1995 Autelitano, 1998
AM	(60 °C; 40)	541	279-302 5'GTGGGCGCTAAGTC GTGGGAAGAG 3'	796-819 5'ATTGTCTCAGTCCGCT CAGGGTGC 3'	Wang et al., 1995; Nagata et al, 1999

Zur Auswertung siehe unter 2.6.

Qualitätssicherung der PCR:

Zur Sicherung der Qualität der PCR wurden die PCR-Gesamtmixe (ohne cDNA und KF), 1-mal nur KF, 1-mal nur cDNA, sowie Minus-RT Proben mit jeder PCR mitgeführt.

2.6. Auswertung der PCR Produkte

2.6.1. Material und Methode

Nach der PCR wurden die Produkte von der Ölphase getrennt und mit einer 3 % Dextran blue/50 % Glycerollösung (Sigma) vermischt und anschließend jeweils 10 µl aus dem Gemisch auf eine kleine Gelkassette mit einem 5%igen, nicht denaturierten Polyacrylamidgel in 1 x TBE Puffer am Sequenzer (ALFexpress, Pharmacia) aufgetragen.

Die Gele liefen in 2 l 1 x TBE Puffer unter folgenden Bedingungen:

Spannung: 900 V; Stromstärke: 50 mA; Leistung: 35 W; Laufzeit: Ø 100 min.

Materialien und Lösungen

Alle Substanzen wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen, wenn nicht anders angegeben.

Rezeptur für ein 5 % Polyacrylamidgel (40 ml)

- **25,5 ml** destilliertes Wasser
- **8 ml** 5 x TBE (Rezeptur zur Herstellung von 1 l 5 x TBE Puffer)
 - 54,0 g Tris Ultra Qualität (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)
 - 27,5 g Borsäure
 - 20,0 ml 0,5 M EDTA (Ditnatriumsalz Dihydrat) Titrierkomplex (pH 8,0)
 - ad 1000 ml mit destilliertes H₂O
- **6 ml** Acrylamidrotiphoeseegel
- **300 µl** 10 % APS (Ammoniumpersulfat) (Sigma)
- **15 µl** TEMED

Das Gel trocknete für jeweils 40-60 min in der Kassette, bevor die Proben aufgetragen wurden.

Die Auswertung erfolgte nach Auftrennung der PCR-Produkte in dem 5 %igem Polyacrylamidgel (s.o.). Dabei wurden die CY5-markierten Banden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Laser-Detektors des DNA-Sequenzers (ALFexpress; Pharmacia Biotech) erfasst und mit Hilfe der ALF-express™ Software (Pharmacia) analysiert und quantifiziert.

Die Angabe des Gehaltes an Zytokin-cDNA in der Probe erfolgte in Units. 1 Unit entsprach dabei der Menge an KF, die mittels PCR bei den gegebenen Reaktionsverhältnissen eine im vorliegenden Auswertungssystem gerade noch messbare Bande erzeugte. Bei einem gleichen Mengenverhältnis zwischen dem KF und der cDNA wurde die cDNA in Units entsprechend der dezimalen Verdünnungsstufe des KF berechnet.

Für die Auswertung der PCR-Produkte, die ohne KF Ko-Amplifikation durchgeführt worden sind (siehe unter 2.5.4.), entsprach die analysierte Länge (Peak Area) der Bande der Menge an cDNA.

Die Reihe 1 in Abb. 2 stellt eine noch unverdünnte cDNA-Probe dar. Die Menge der cDNA (Peak Area 3248) ist größer als die des KF (Peak Area: 2107). Nachfolgend mussten die Proben cDNA weiter verdünnt werden, um ein Verhältnis 1:1 zwischen KF-cDNA und der Ziel-DNA wie in Reihe 2 zu erhalten. Die 2. Reihe zeigt das Verhältnis 1:1 zwischen dem β -Actin-Gehalt des KF und der Proben cDNA. Die „Peak Area“ entspricht der Menge der cDNA und die „Run Time“ der Basenpaarenlänge (Die β -Actin cDNA des KF ist kürzer als das der Proben cDNA (siehe unter 2.5.2.)) Diese Probe (2) wurde in jeder Zytokin-PCR 1:3 vorverdünnt eingesetzt.

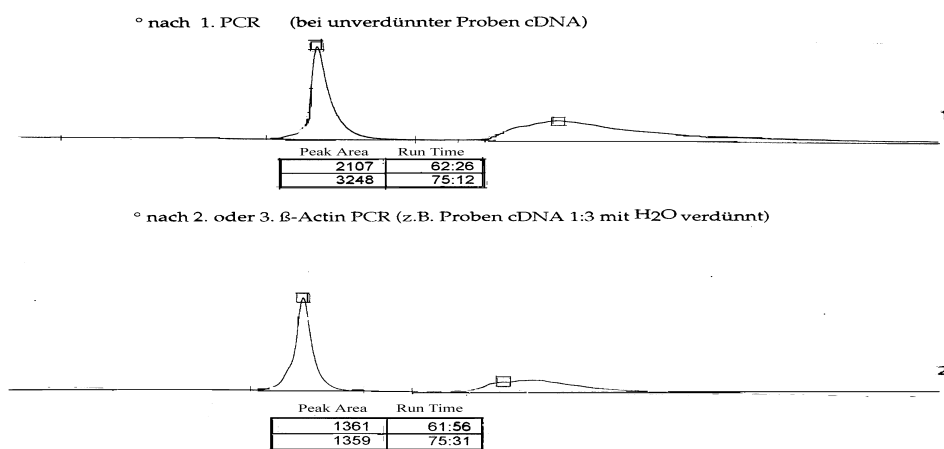


Abb. 2: Bildbeispiel für β -Actin Auswertung mit Hilfe der ALF-express™ Software

Bei der Auswertung mit dem ALFexpress Sequenzer war es nicht möglich die Basenpaarenlänge der PCR Produkte zu bestimmen, deshalb wurden zur Kontrolle der gesuchten DNA Banden die Proben auf einem 1 %igem Ethidiumbromid-Agarosegel zusammen mit einer 100 bp DNA Leiter (GIBCOBRL) aufgetragen. (siehe auch unter 2.3.2.)

2.7. Die Bestimmung von TNF- α mit TNF- α -Bioassay

Die Menge an freiem, biologisch wirksamen TNF- α wurde im Bioassay bestimmt. Grundlage des Bioassays ist die toxische Wirkung von TNF- α auf die Fibroblasten-Zell-Linie L929 der Maus [Flick & Gifford, 1984]. Die Zellen wurden - wie unter Punkt 2.1.2. erläutert - kultiviert. Die Durchführung des TNF- α Bioassay erfolgte wie von Freyer et al. [1999] beschrieben. Die L929-Zellen wurden mit den Zellkultur- Überständen in Anwesenheit von 1

$\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D für 20 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde durch die Aufnahme von Kristallviolett in den lebenden Zellen bestimmt, welche spektrophotometrisch bei 595 nm mit einem MR5000 ELISA-Reader (Dynatech, Denkendorf) quantifiziert wurde. Als Standard, in äquivalenten Konzentrationen, diente rekombinantes TNF- α der Ratte, das uns von Dr. P. Scholz von der Schering AG, Berlin zur Verfügung gestellt wurde.

2.8. Quantitative Bestimmungen der Zytokine mit dem ELISA

Die quantitative Bestimmung der Zytokine (IL-1 β ; IL-6; IL-10) und MIP-2 in den Überständen der Proben (nach 8 h Stimulation) erfolgte mit Hilfe der ELISAs von Biosource Deutschland GmbH (Ratingen). Die Durchführung der ELISA erfolgte nach der beiliegenden Vorschrift des Herstellers.

2.9. Quantitative Bestimmung von SP und SP₁₋₇ mit dem RIA

Sämtliche RIAs wurden während meines Laboraufenthaltes im Oktober 1998 bei Prof. Nyberg, Division of Biological Dependence on Drug Research, Department of Pharmacology, University of Uppsala in Schweden durchgeführt.

Von den gleichen Überständen, von denen schon die Zytokine bestimmt worden waren, erfolgte mit Hilfe der RIA die Messung von SP und SP₁₋₇. Da die Überstände einen relativ geringen Proteingehalt hatten, konnte auf eine Reinigung der Proben verzichtet werden. Der RIA beruht auf dem von Berson und Yalow [1968] beschriebenen Prinzip.

2.9.1. Materialien und Methodik

Alle Materialien, Antikörper, Substanzen wurden mir freundlicherweise im Gastlabor zur Verfügung gestellt.

Die Tracer (Indikatoren) sind Substanz P Analoge Tyr⁸-SP (Peninsula, USA), Tyr¹-SP₁₋₇ die nach der Standard Chloramin-T Methode mit ¹²⁵I-Na markiert im Labor hergestellt wurden. Die Antikörper wurden ebenfalls im Labor hergestellt. Die allgemeine Prozedur der Antikörperherstellung wurde von Persson et al. [1992] (Mitarbeiter des Labors) publiziert.

Antikörper

Die SP-Antikörper wurden von einer Stammkonzentration 1:100 auf eine Gebrauchslösung von 1:80 000 mit Gelpuffer verdünnt.

Der SP₁₋₇ Antikörper wurde für den Test 1:220 000 mit Gelpuffer verdünnt.

SP/ SP₁₋₇ Standard

Aus den synthetischen Peptiden SP und SP 1-7 (Peninsula, USA) wurden Stocklösungen von 9×10^{-5} M angesetzt. 10 µl dieser Lösung wurden jeweils mit 990 µl MeOH/HCL 1:1, auf 9×10^{-7} M verdünnt und dienen als Stammlösung für den Standard. Insgesamt wurden 9 Standardkonzentrationen zwischen 9×10^{-8} M bis 9×10^{-12} M gewählt.

Folgende Lösungen und Puffer wurden frisch angesetzt:

- **MeOH/ 0,1M HCL 1:1 (z.B. 100ml)**

- 50 ml MeOH
- 5 ml 1M HCL
- 45 ml destilliertes H₂O

- **Gelpuffer: (z.B. 100ml)**

- 0,10 g Gelatine
- 0,93 g EDTA
- 0,82 g NaCl
- 75 ml destilliertes H₂O
- 25 ml Na Phosphat Puffer 0,2 M (pH 7,4) z.B. 500 ml
 - 405 ml 0,2 M Na₂HPO₄·2H₂O + 95 ml 0,2 M NaH₂PO₄·H₂O

Der Gelpuffer wurde erst bei 60 °C vollständig gelöst und anschließend auf Eis auf RT abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von:

- 0,1 g (0,1 % w/v) BSA

Nachdem sich BSA komplett gelöst hatte, wurde der Gelpuffer auf einen pH- Wert von 7,4 mit einer 5-10 M NaOH-Lösung eingestellt und bei 4 °C gelagert.

- **Kohlelösung (Charcoal)(z.B. 200ml)**

1. 1.0,5 g Aktivkohle (Sigma) + 100 ml 50 mM Na-Phosphat-Puffer
2. 2.0,05 g Dextran 70T (Pharmacia) + 100 ml 50 mM Na-Phosphat-Puffer

Beide Lösungen wurden getrennt angesetzt, komplett gelöst und anschließend wurde die Lösung 2 in die Lösung 1 gegeben und bei 4 °C gelagert.

Der RIA wurde nach folgendem Protokoll angesetzt:

Tab. 5: RIA-Ansatz-Protokoll

		1.Tag	1.Tag	1.Tag	2.Tag
Röhrchen Inhalt	Röhrchen Nr.	25µl	100µl	100µl	200µl
Totalaktivität	1-3	MeOH/HCL	Gelpuffer	Indikator (Tracer) 4500-5000 cpm/100µl	destilliertes H ₂ O
Nullstandardaktivität (Bezugswert)	4-6	MeOH/HCL	Antikörper	Indikator (Tracer)	Kohlelösung
Standard 9-1	7-33	Standardproben	Antikörper	Indikator (Tracer)	Kohlelösung
Blank	34-36	MeOH/HCL	Gelpuffer	Indikator (Tracer)	Kohlelösung
Proben	37-?	Proben	Antikörper	Indikator (Tracer)	Kohlelösung

Bemerkungen:

1. Der Antikörper und der Indikator (Tracer) wurden mit Gelpuffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Der Indikator (Tracer) sollte dabei einen Wert zwischen 4500-5000 cpm /100µl haben. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am 2. Tag erfolgte die Zugabe von 200 µl Kohlelösung (Ausnahme Totalaktivität). Es folgt eine Inkubation für 10 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 1 min in der Beckman-Mikrozentrifuge®. Danach erfolgte das Überpipettieren von 300 µl der oberen Phase in neue Röhrchen und die Messung des gebundenen radioaktiv markierten Indikators (Tracer) am Gammacounter (Beckman).

Die Konzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve ermittelt.

2.10. Bestimmung von Adrenomedullin(1-50) Enzym immunoabsorbet assay (EIA)

Aus den Zellkulturüberständen wurde die Menge an freigesetztem AM(1-50) bestimmt. Es wurde ein „Enzym immunoabsorbet assay“ (EIA) von der Firma Phoenix Pharmaceutical (USA) verwendet. Die Durchführung des EIA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.11. Angewendete statistische Verfahren

Die Daten sind angegeben worden als Mittelwert \pm Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test für die Güte der Anpassung wurde die Normalverteilung der Messwerte überprüft. Bei normalverteilten Messwerten wurde der ungepaarte t-Test nach Student zum Vergleich der Mittelwerte verwendet. Zur Berechnung wurde das Statistikprogramm SPSS 7.5 für Windows 95 (SPSS, Chicago, IL) genutzt. Nur Werte mit $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

2.12. Darstellung der Ergebnisse

2.12.1. Darstellung der Ergebnisse über den Einfluss von CGRP/CGRP₈₋₃₇ und SP/SR140 333 auf die Zytokin mRNA-Expression und Freisetzung

Für die Darstellung der Ergebnisse gilt, wenn nicht anders angegeben:

1. PCW wurde in allen Experimenten immer in einer Standardkonzentration von 5×10^5 cfu/ml eingesetzt, deshalb erfolgt in den Abbildungen kein weiterer Hinweis auf die Konzentrationsangabe von PCW.
2. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 4-21 zur Darstellung der mRNA-Expression und Proteinfreisetzung wegen der großen Schwankungen von Experiment zu Experiment und zur besseren Übersicht in Prozent angegeben. Dabei stellen die Werte der mit PCW-stimulierten Gruppe 100 % dar, alle weiteren Werte werden darauf bezogen. Eine Ausnahme besteht jeweils in dem Vergleich der mit PCW+CGRP 10 nM und PCW+CGRP 10 nM+CGRP₈₋₃₇ 1 μ M- stimulierten Gruppe sowie PCW+SP 10 nM und PCW+SP 10 nM+SR140333 1 μ M, wobei hier die Werte der PCW+CGRP 10 nM bzw. PCW+SP10 nM stimulierten Gruppen 100 % darstellen.

3. Die Kontrollgruppen sind jeweils gegenüber den PCW-stimulierten Gruppen statistisch hoch signifikant verschieden ($p < 0,001$), sodass hier auf eine besondere Kennzeichnung in den Abbildungen verzichtet worden ist.

Im Anhang des Ergebnisteils ist die Zusammenstellung aller Ergebnisse in tabellarischer Form aufgelistet. Dort sind auch die Konzentrationen in Units für die mRNA-Expression sowie die Proteinkonzentration in pg/ml bzw. ng/ml für die Zytokin-Freisetzung soweit wie möglich angegeben.

2.12.2. Darstellung der Ergebnisse der CRLR- und AM mRNA Expression

1. Die Darstellung des Zeitverlaufs der CRLR mRNA und AM mRNA-Expression unter Einwirkung von PCW sind in Prozent angegeben und auf die Kontrolle (=100 %) bezogen worden.
2. Der Vergleich zwischen der Zugabe von CGRP und der PCW-Stimulation wurde wie bei der Zytokin-Expression durchgeführt. Die Angaben erfolgten in Prozent und wurden jeweils auf den Referenzwert PCW (=100 %) bezogen.
3. Eine Ausnahme erfolgte bei der Darstellung des Vergleiches zwischen den mit PCW+CGRP 10 nM und den mit PCW+CGRP 10 nM+CGRP₈₋₃₇ 1 μ M stimulierten Gruppen. Hierbei wurden die Werte auf 100 % der mit PCW+CGRP10nM-stimulierten Gruppen bezogen. (weitere Einzelheiten siehe auch unter 2.12.1.)

3.0. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der β -Actin mRNA-Expression

Bevor die Experimente zur Untersuchung des Einflusses von CGRP und SP bei stimulierten zerebralen Endothelzellen durchgeführt worden sind, wurde die β -Actin mRNA-Expression der Endothelzellen bei Stimulation mit Zellwänden von *S. pneum.* (PCW) überprüft, da die Expression des β -Actin-Gens als ein unerlässliches Maß zur Einstellung gleicher cDNA-Probenmengen bei den Experimenten dienen sollte.

Für diesen Zweck wurde die RNA von kultivierten zerebralen Endothelzellen sowie von Endothelzellen die mit PCW 5×10^5 cfu/ml 4 h stimuliert worden sind isoliert. Die Proben wurden auf einen RNA-Gehalt von $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und in cDNA durch Reverse Transkription umgeschrieben. Anschließend wurde die kompetitive β -Actin-PCR mit dem Kontrollfragment (KF 10^{-5}) (siehe auch Kapitel Material und Methoden) durchgeführt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den mit PCW-stimulierten Proben ($p > 0,05$) und den Kontrollproben gefunden werden (Abb. 3).

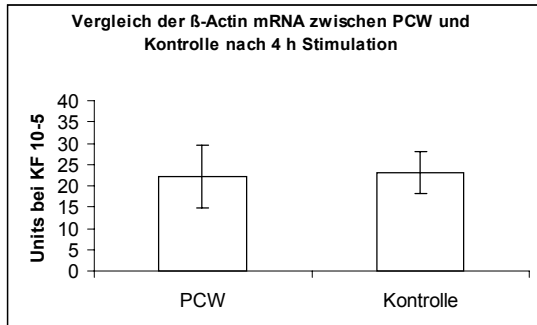


Abb. 3: β -Actin-mRNA-Expression zwischen PCW($n=8$) und Kontrollen ($n=8$) ist nicht signifikant verschieden $p > 0,05$

3.2. Einfluss von CGRP und CGRP₈₋₃₇ sowie SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2

3.2.1. Einfluss von CGRP und CGRP₈₋₃₇ auf die mRNA-Expression und Freisetzung der Zytokine

Der Einfluss von CGRP und CGRP₈₋₃₇ auf die mRNA-Expression und Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 sowie MIP-2 wurde wie folgt analysiert:

Die alleinige Zugabe von CGRP in den Konzentrationen von 1, 10 und 100 nM, führte zu keiner Veränderung der mRNA-Expression der untersuchten Zytokine gegenüber der nur mit RPMI-Medium inkubierten Kontrollgruppe (Abb. 4A; 6A; 8A; 10A; 12A) und auch die nach 8 h gemessene Freisetzung der Zytokine zeigte unter Zugabe von 1 nM CGRP keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. Die Freisetzung von TNF- α wurde zusätzlich bereits nach 4 h gemessen, wobei keine der getesteten CGRP-Konzentrationen (1, 10, 100 nM) zu einer signifikanten Veränderung führte (Abb. 4C; 6B; 8B; 10B; 12B u. 4B).

Regulation der PCW-induzierten mRNA-Expression

Für alle Zytokine wurde die Zugabe von 1, 10 und 100 nM CGRP zur Stimulation mit PCW untersucht (Abb. 4A; 6A; 8A; 10A; 12A). Dabei erwies sich die Zugabe von 10 nM CGRP als die Konzentration, die zu einer maximalen Erhöhung der mRNA-Expression aller untersuchter Zytokine und MIP-2 führte. 1 nM CGRP erhöhte nur bei TNF- α , IL-6, IL-10 und MIP-2 (Abb. 4A; 8A; 10A; 12A) und 100 nM CGRP nur bei TNF- α , IL-6 und MIP-2 die mRNA-Expression signifikant (Abb. 4A; 8A; 12A).

Um festzustellen, ob dieser Effekt der erhöhten mRNA-Expression über den CRLR-(CGRP-1)-Rezeptor vermittelt ist, wurde zusätzlich zu den 10 nM CGRP 1 μ M CGRP₈₋₃₇ zugegeben. Dies bewirkte eine signifikante Inhibition der erhöhten mRNA-Expression aller Zytokine und MIP-2 auf das Niveau der Zytokin-Expression der nur mit PCW-stimulierten Zellen (Abb. 5A; 7A; 9A; 11A u. 13A).

Des Weiteren wurde untersucht, ob bereits 1 μ M CGRP₈₋₃₇ allein eine Inhibition der PCW-induzierten Zytokin-mRNA-Expression bewirkt. Es konnte hierbei jedoch für kein Zytokin ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen gefunden werden (Abb. 5B; 7B; 9B; 11B u. 13B).

Freisetzung von bioaktiven TNF- α und IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 Protein

Im wesentlichen korrelieren die Ergebnisse der Zytokin-Freisetzung mit denen für die mRNA-Expression. So bewirkte die Zugabe von 10 nM CGRP ebenfalls eine signifikante Erhöhung von IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 in den Zellkulturüberständen nach 8 h als auch von freiem TNF- α nach 4 h (Abb. 4B; 6B; 8B; 10B; 12B). Allerdings bewirkte die Zugabe von 1 nM CGRP nur die Erhöhung von freiem TNF- α nach 4h, während es nach 8h, wie auch die Zugabe von 10 nM CGRP, zu einer signifikanten Verringerung der TNF- α -Freisetzung gegenüber den nur mit PCW-stimulierten Zellen führte (Abb. 4B,C). Die Stimulation mit 100 nM CGRP führte zu einer signifikanten Erhöhung der freigesetzten IL-1 β und IL-10 Konzentration (Abb. 6B u. 10B).

Wie schon auf der Ebene der mRNA-Expression gezeigt worden ist, hemmte die zusätzliche Gabe von 1 μ M CGRP₈₋₃₇ zur Stimulation mit 10 nM CGRP signifikant die Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 nach 8 h sowie die Freisetzung von freiem TNF- α nach 4 h (Abb. 7C; 9C; 11C; 13C u. 5C).

Im Gegensatz zur mRNA-Expression bewirkte die Gabe von 1 μ M CGRP₈₋₃₇ eine hoch signifikante Verringerung der PCW-induzierten Freisetzung von TNF- α nach 4 h und 8 h sowie von IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 (Abb. 5D,F; 7D; 9D; 11D; 13D).

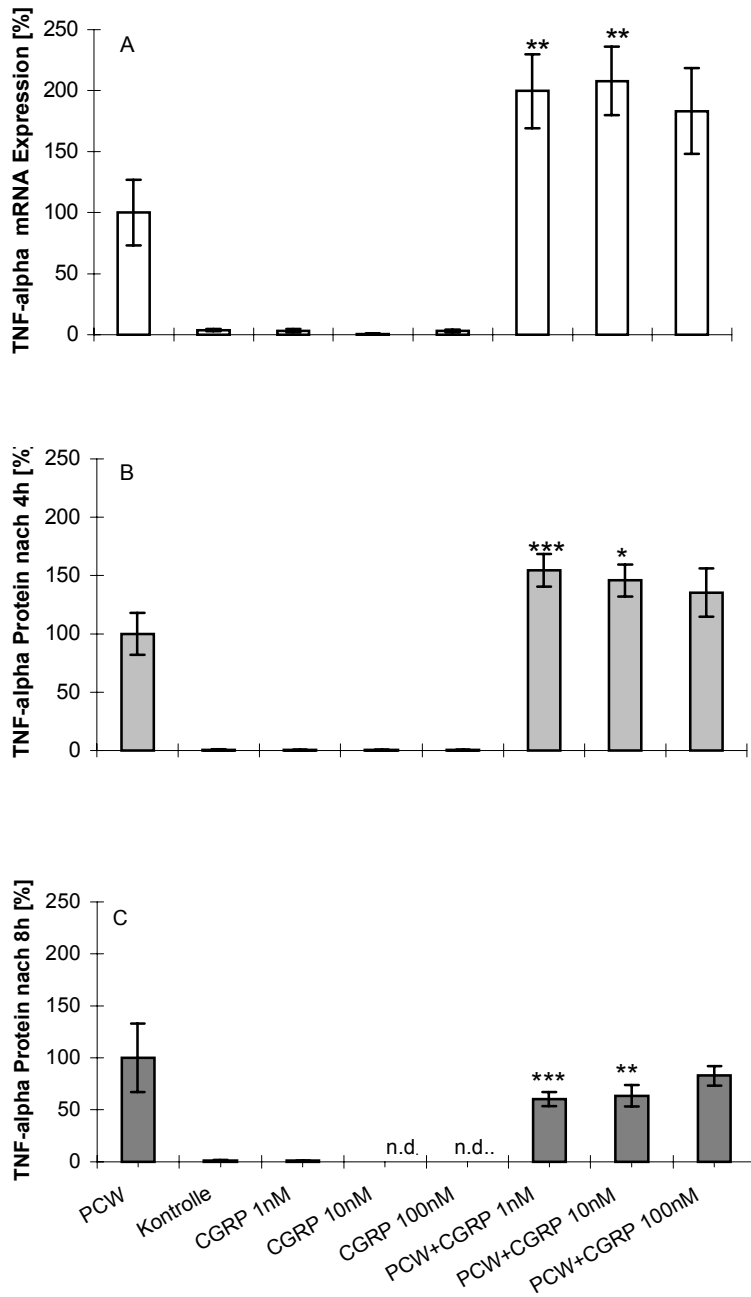


Abb. 4A-C: Wirkung von CGRP auf die TNF- α mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und TNF- α -Freisetzung nach 4 h (B) bzw. 8 h (C). $n \geq 4$ bzw. 3 für (PCW+CGRP100nM) aus mindestens 3 unabhängigen Einzelexperimenten, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

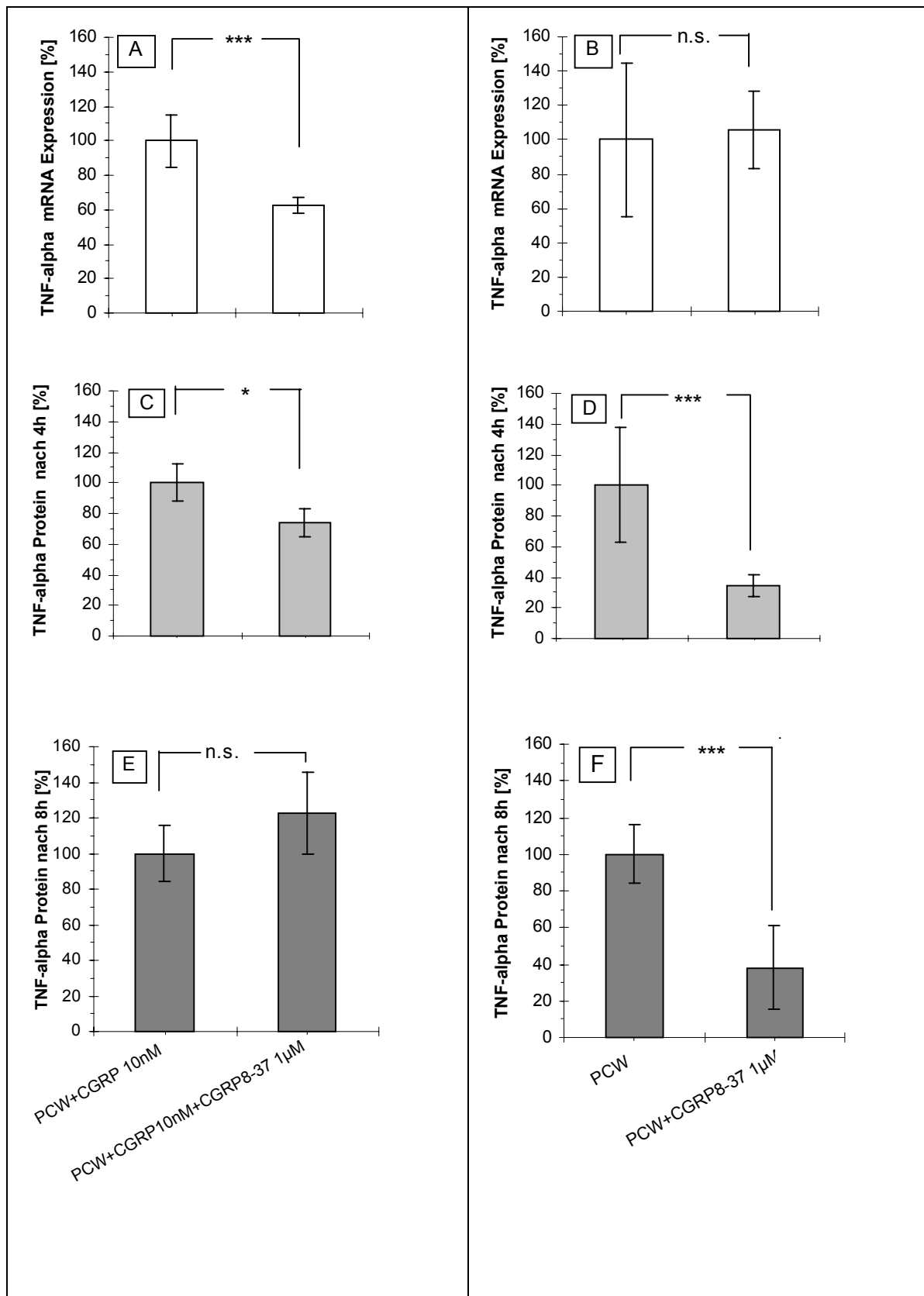


Abb. 5A-F: Wirkung von CGRP₈₋₃₇ 1 µM auf die TNF-α-mRNA-Expression (A, B) und TNF-α-Freisetzung nach 4 h (C, D) und 8 h (E, F), n=4 aus 4 unabhängigen Einzelexperimenten, ***p<0,001, *p<0,05 gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM bzw. PCW-stimulierten Gruppe

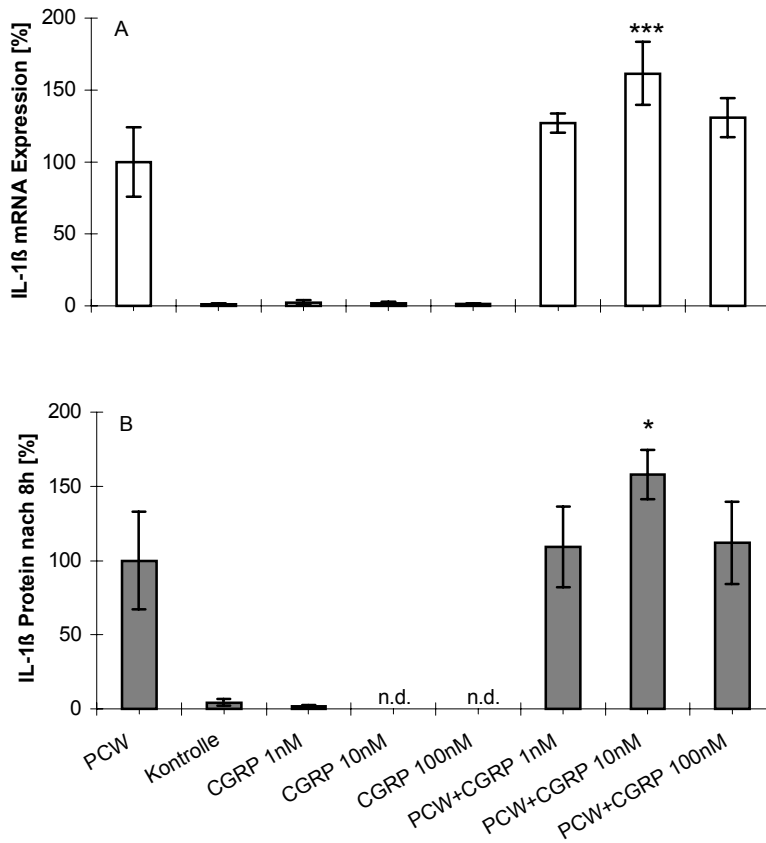


Abb. 6A-B: Wirkung von CGRP auf die IL-1 β -mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-1 β -Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Einzelexperimenten, *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

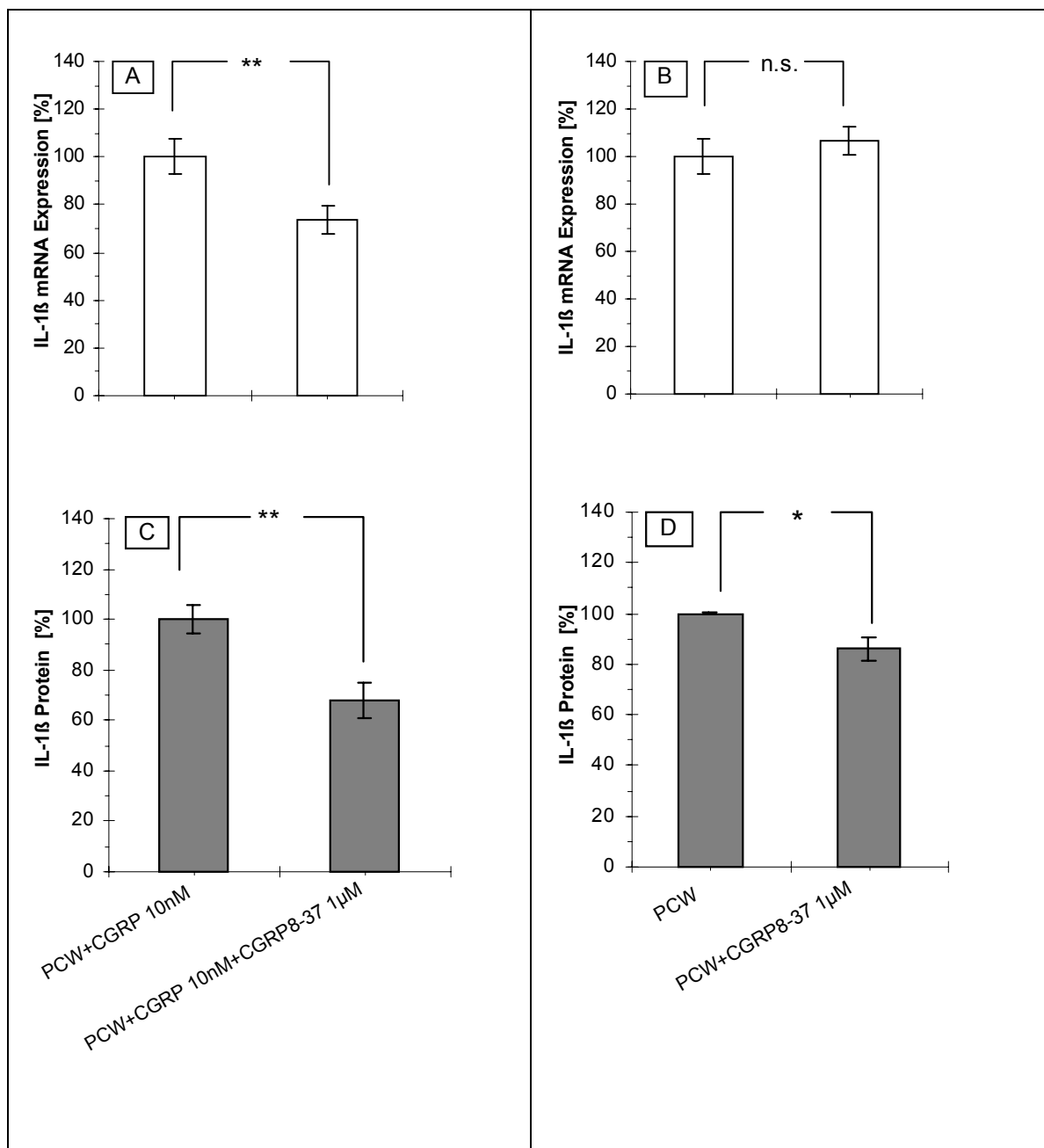


Abb. 7A-D: Wirkung von CGRP₈₋₃₇ 1 μM auf die IL-1β-mRNA-Expression (A; B) und IL-1β Proteinfreisetzung (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Einzelerperimenten, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM bzw. PCW-stimulierten Gruppe.

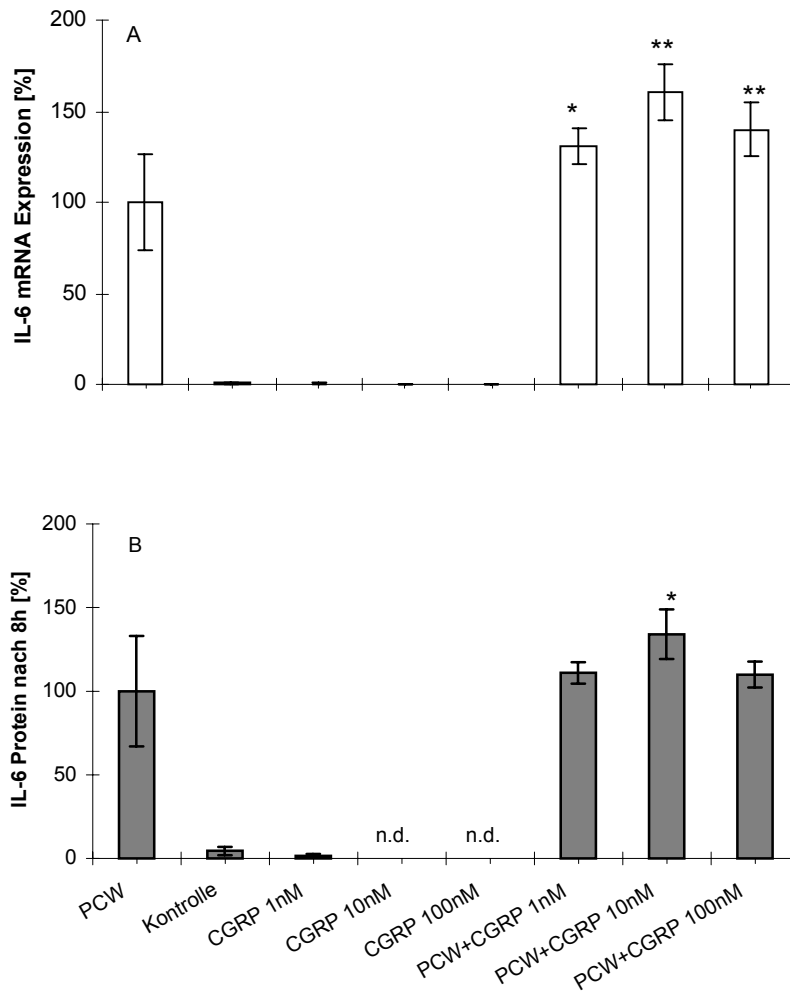


Abb. 8A-B: Wirkung von CGRP auf die IL-6 mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-6-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

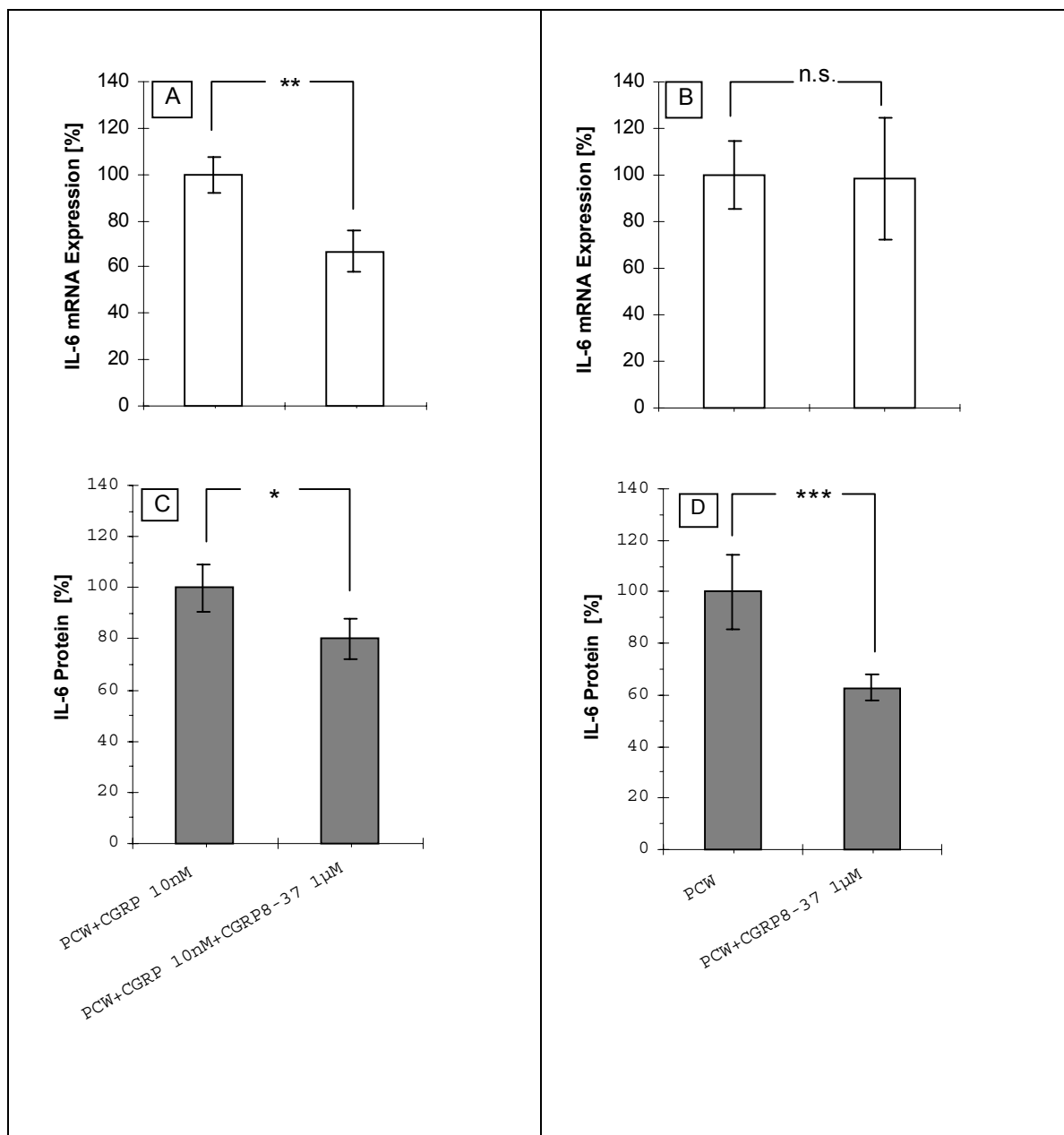


Abb. 9A-D: Wirkung von CGRP₈₋₃₇ 1 µM auf die IL-6-mRNA-Expression (A, B) und IL-6-Proteinfreisetzung (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Einzelerperimenten, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM bzw. PCW-stimulierten Gruppe

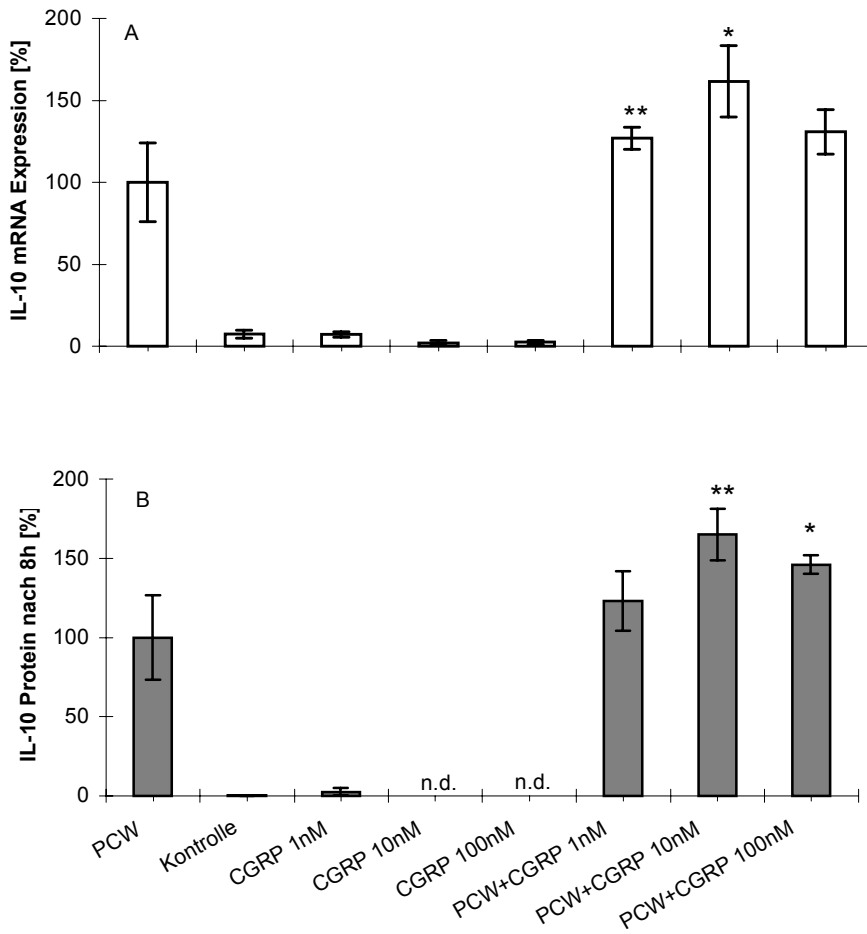


Abb. 10A-B: Wirkung von CGRP auf die IL-10-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-10-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

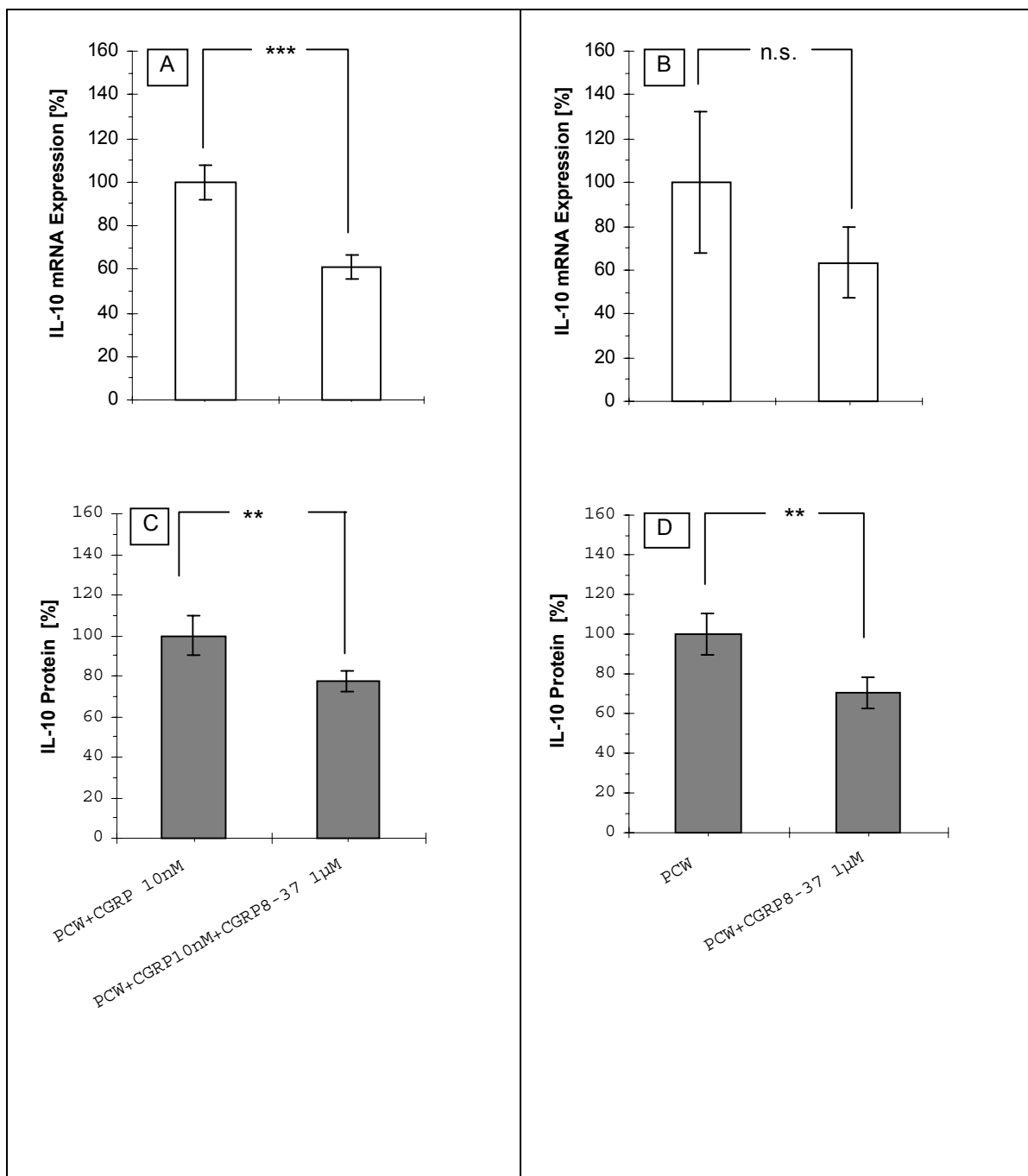


Abb. 11A-D: Wirkung von CGRP8-37 1 μ M auf die IL-10-mRNA-Expression (A, B) und IL-10-Proteinfreisetzung (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Einzelerperimenten, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM- bzw. PCW-stimulierten Gruppe

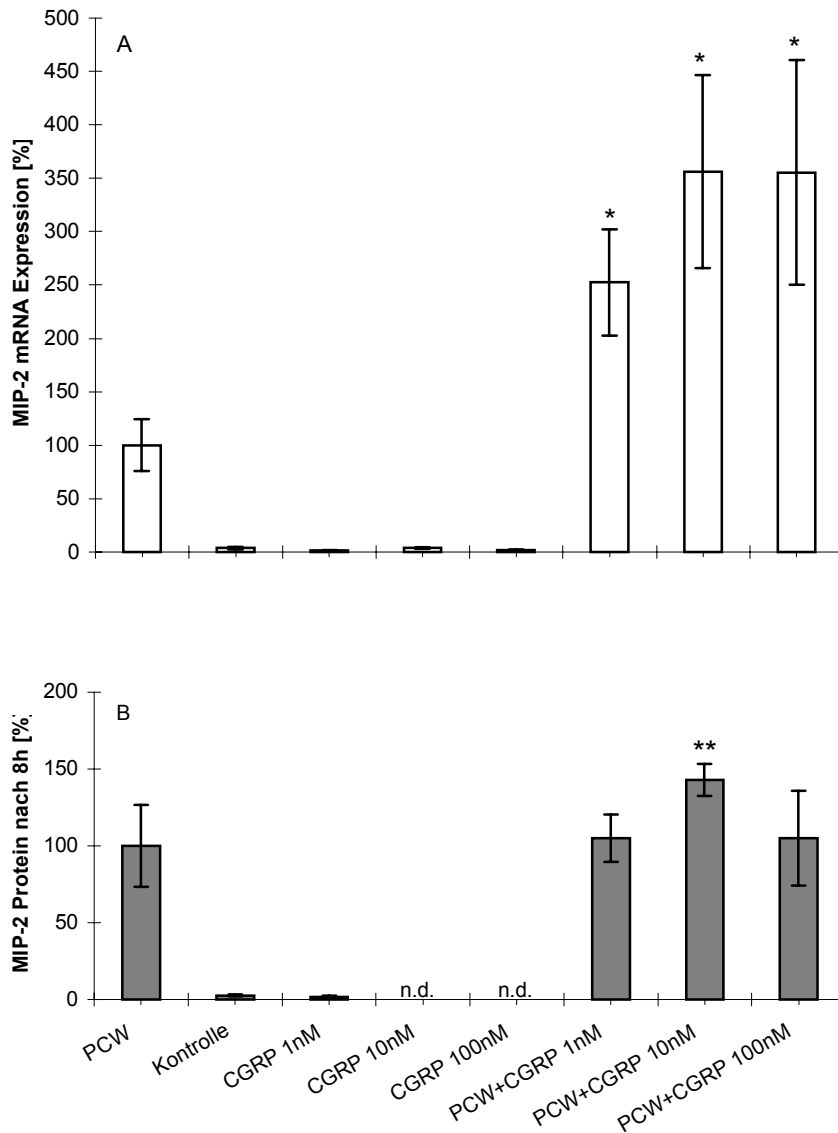


Abb. 12A-B: Wirkung von CGRP auf die MIP-2-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und MIP-2-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

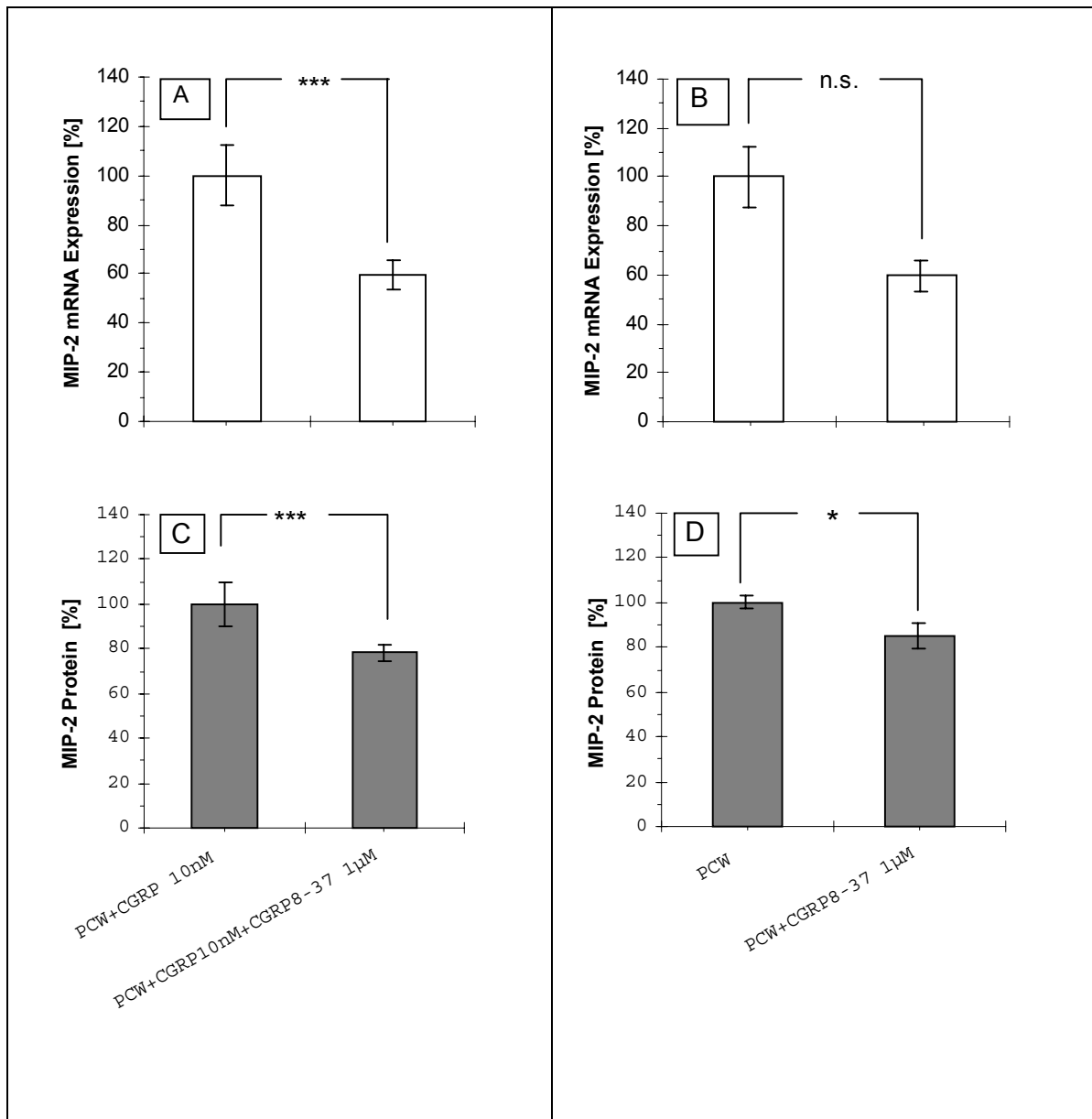


Abb. 13A-D: Wirkung von CGRP₈₋₃₇ 1 μM auf die MIP-2-mRNA-Expression (A, B) und MIP-2-Proteinfreisetzung (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Einzelexperimenten, ***p<0,001, *p<0,05 gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM - bzw. PCW-stimulierten Gruppe

3.2.2. Einfluss von SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und - Freisetzung

Insgesamt gesehen ist der Einfluss von SP weniger eindrucksvoll, dafür aber differenzierter. Wiederum bewirkte die alleinige Gabe von SP in den Konzentrationen von 10 und 100 nM keine Veränderung der mRNA-Expression und der Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-10 und MIP-2 gegenüber der nur mit RPMI-Medium inkubierten Kontrollgruppe (Abb. 14A, B, C; 16A, B; 19A, B; 21A, B). Ausnahmsweise führte die Stimulation mit 10 nM SP zu einer um 5 % erhöhten IL-6-mRNA-Expression sowie zu einer um 2 % gesteigerten Freisetzung von IL-6 gegenüber der Kontrolle (Abb. 17A, B).

Regulation der mRNA-Expression

Es wurde untersucht, ob SP in den Konzentrationen von 10 und 100 nM die durch die PCW-induzierte mRNA-Expression der Zytokine beeinflusst (Abb. 14A; 16A; 17A; 19A; 21A). Dabei bewirkte nur 10 nM SP eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6 und MIP-2 gegenüber der PCW stimulierten Gruppe.

Die Zugabe von 100 nM SP bewirkte bei allen untersuchten Zytokinen und MIP-2 keine signifikante Änderung der mRNA-Expression (Abb. 14A; 16A; 17A; 19A; 21A).

Die zusätzliche Gabe von 1 μ M des NK-1-Antagonisten SR140333 zu 10 nM SP bewirkte nur eine signifikante Hemmung der IL-10-mRNA-Expression gegenüber der PCW-stimulierten Gruppe (Abb. 20A). Die Zugabe von 10 μ M SR140333 dagegen wirkte differenzierter. So führten 10 μ M SR140333 zu einer signifikanten Erhöhung der TNF- α -mRNA-Expression und zu einer signifikanten Hemmung von IL-6 und IL-10 gegenüber der PCW-Gruppe (Abb. 15B; 18B; 20B). Keine Wirkung zeigte der NK-1-Antagonist sowohl auf die IL-1 β - und MIP-2-mRNA-Expression als auch auf deren Freisetzung.

Freisetzung von bioaktiven TNF- α und IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 Protein

Die Zugabe von 10 nM SP wirkte sich verschieden auf die Freisetzung der Zytokine aus. Einmal führte die Zugabe von 10 nM SP nach 4 h zu einer signifikant geringeren TNF- α -Konzentration im Zellkulturüberstand, während es nach 8 h zu einem signifikant erhöhten MIP-2-Proteingehalt kam (Abb. 14B; 21B). Dagegen hatte die Zugabe von 100 nM SP keinen Effekt auf die mRNA-Expression, führte aber zu signifikant erhöhten Konzentrationen von IL-1 β und MIP-2 im Kulturüberstand (Abb. 16B; 21B). Keine Wirkung zeigte SP auf die Freisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-10 nach 8 h.

Die zusätzliche Gabe von 1 μM SR140333 zur Gabe von 10 nM SP bewirkte nur eine signifikante Hemmung der TNF- α Freisetzung nach 8 h gegenüber der Gruppe mit alleiniger Zugabe von 10 nM SP zu PCW (Abb. 15F).

Die durch PCW-stimulierte Freisetzung von IL-6, IL-10 und TNF- α nach 4 h und 8 h wurde durch Gabe von 10 μM SR140333 signifikant gehemmt (Abb. 15C,E; 18C; 20C).

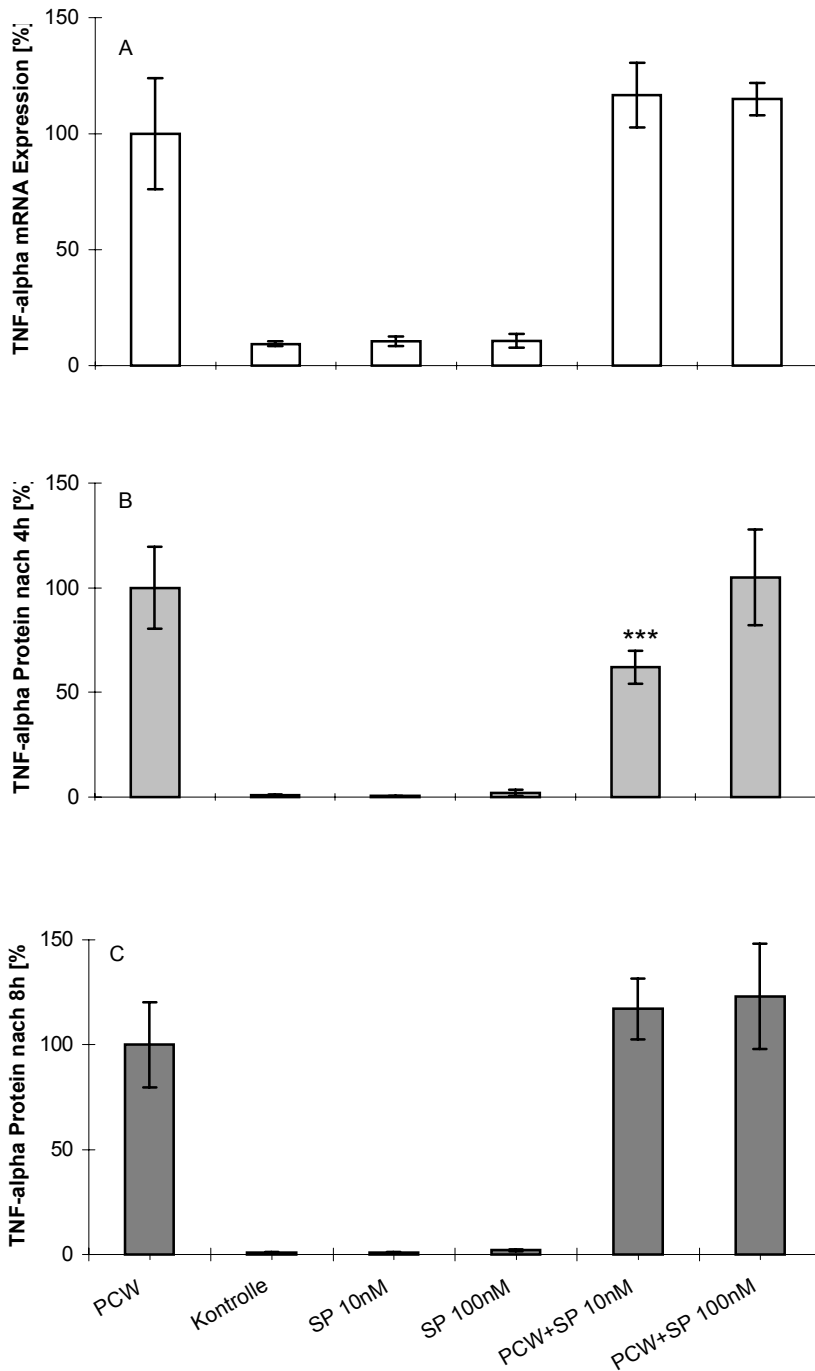


Abb. 14A-C: Wirkung von SP auf die TNF- α mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und TNF- α -Freisetzung nach 4 h (B) bzw. 8 h (C), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, *** $p < 0,001$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

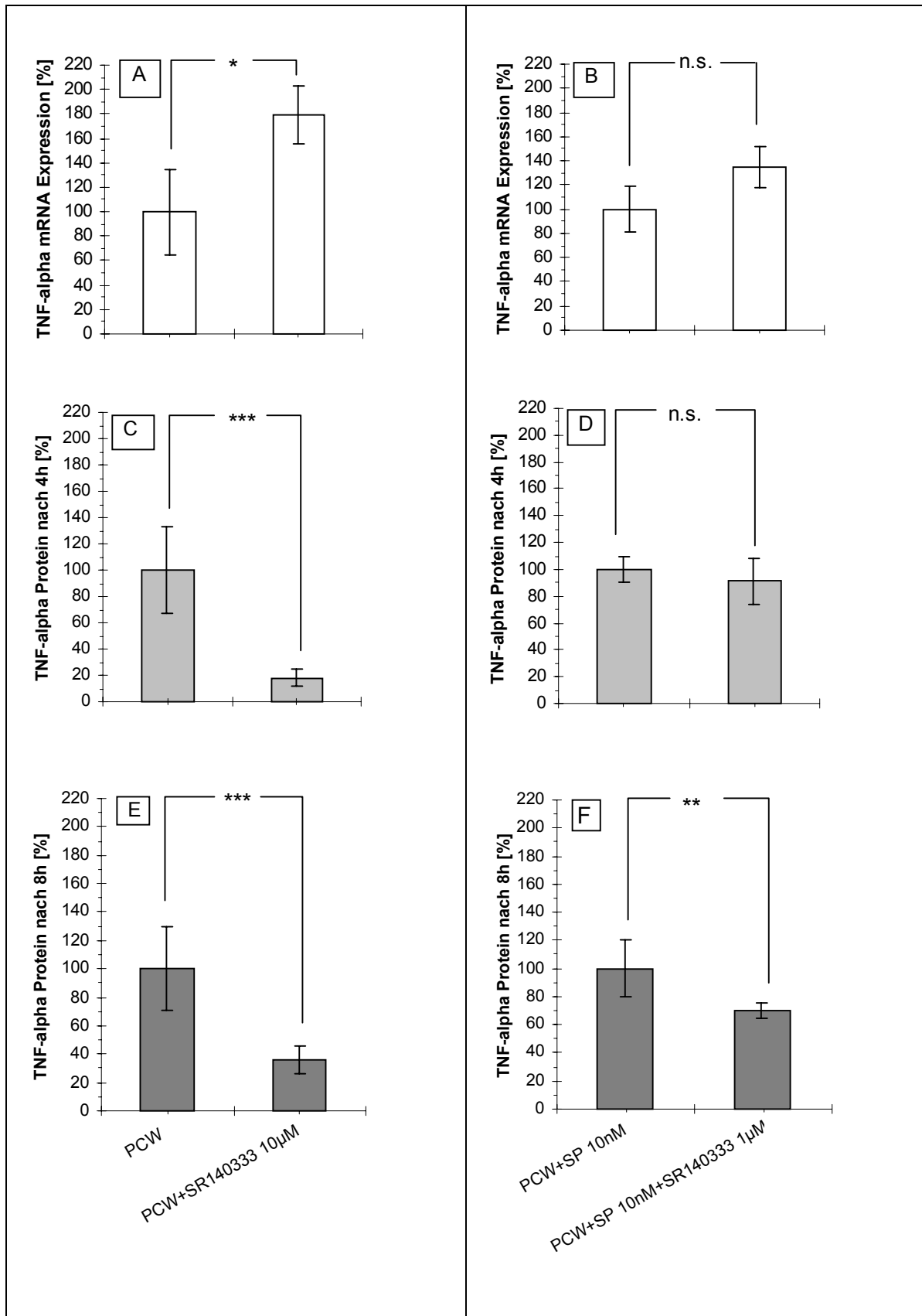


Abb. 15A-F: Wirkung von SR140333 auf die TNF- α mRNA-Expression (A, B) und TNF- α Freisetzung nach 4 h (C, D) und 8h (E, F), n=4 aus 4 unabhängigen Experimenten, ***P<0,001, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der PCW- bzw. PCW+SP10nM-Gruppe.

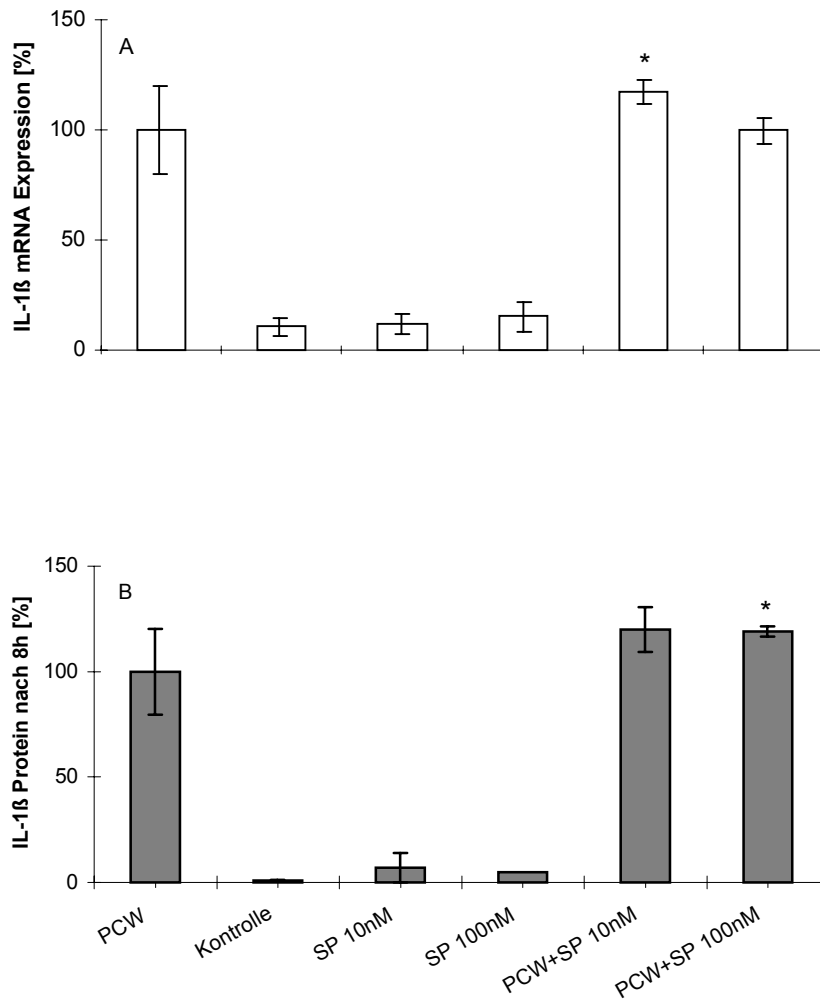


Abb. 16A-B: Wirkung von SP auf die IL-1 β -mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-1 β -Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, * $p < 0,05$ gegenüber der mit PCW-stimulierten Gruppe

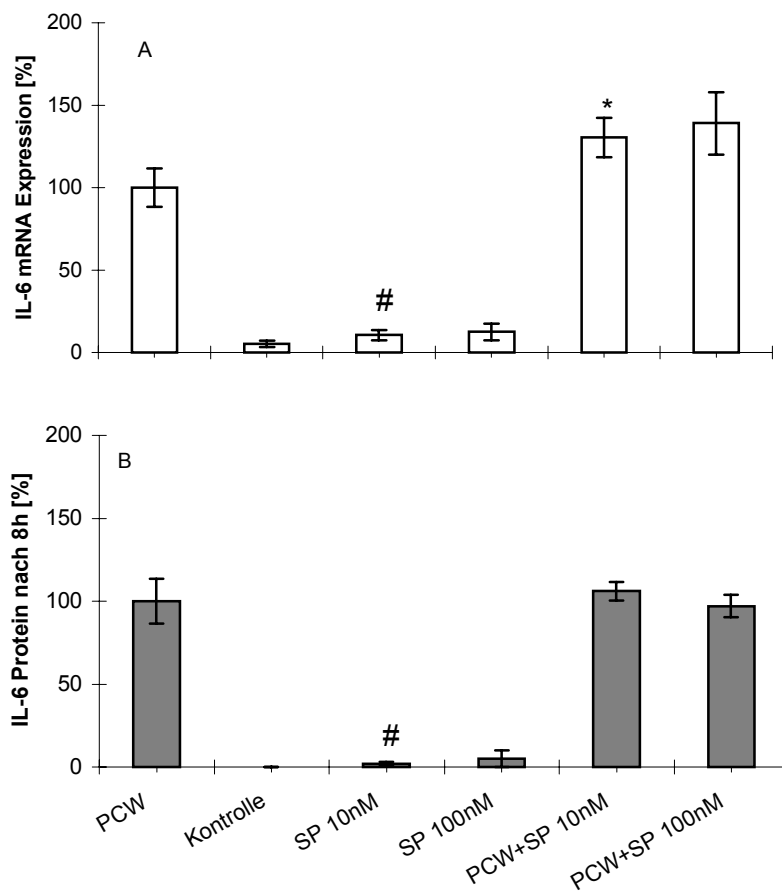


Abb. 17A-B: Wirkung von SP auf die IL-6-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-6-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ aus 4 unabhängigen Experimenten, # $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

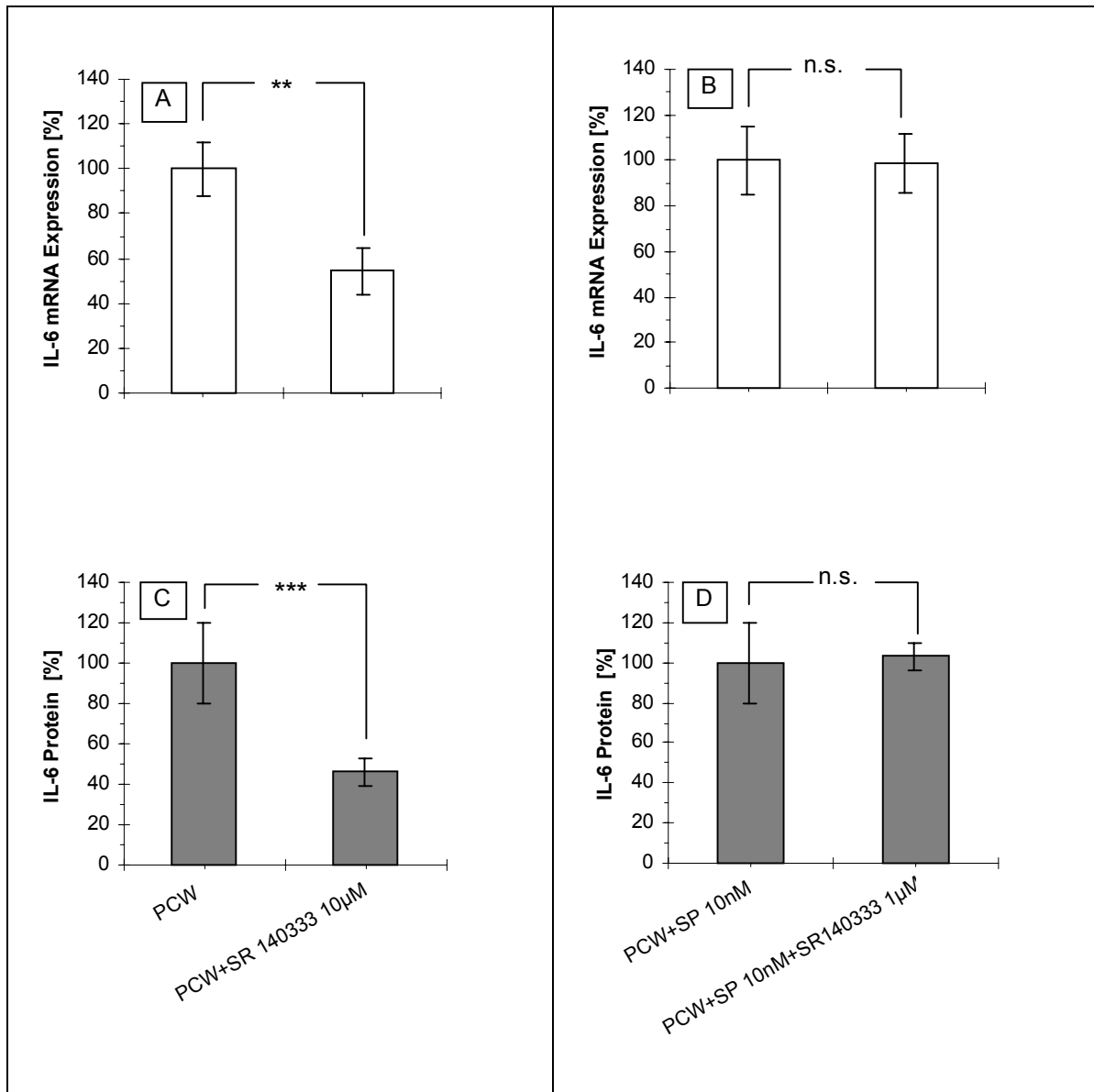


Abb. 18A-D: Wirkung von SR140333 auf die IL-6-mRNA-Expression (A, B) und IL-6-Proteinfreisetzung nach 8 h (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Experimenten, ***p<0,001, **p<0,01 gegenüber der mit PCW- bzw. PCW+SP 10 nM- stimulierten Gruppe

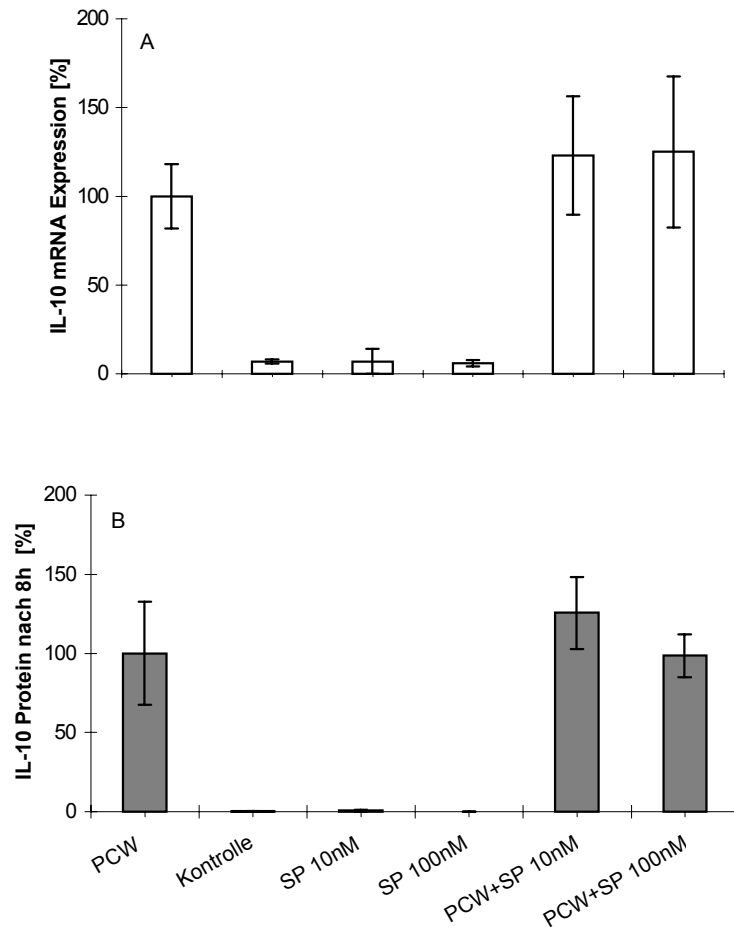


Abb. 19A-B: keine Wirkung von SP auf die IL-10-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und IL-10-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ von unabhängigen 4 Experimenten, $p > 0,05$ gegenüber der mit PCW-stimulierten Gruppe

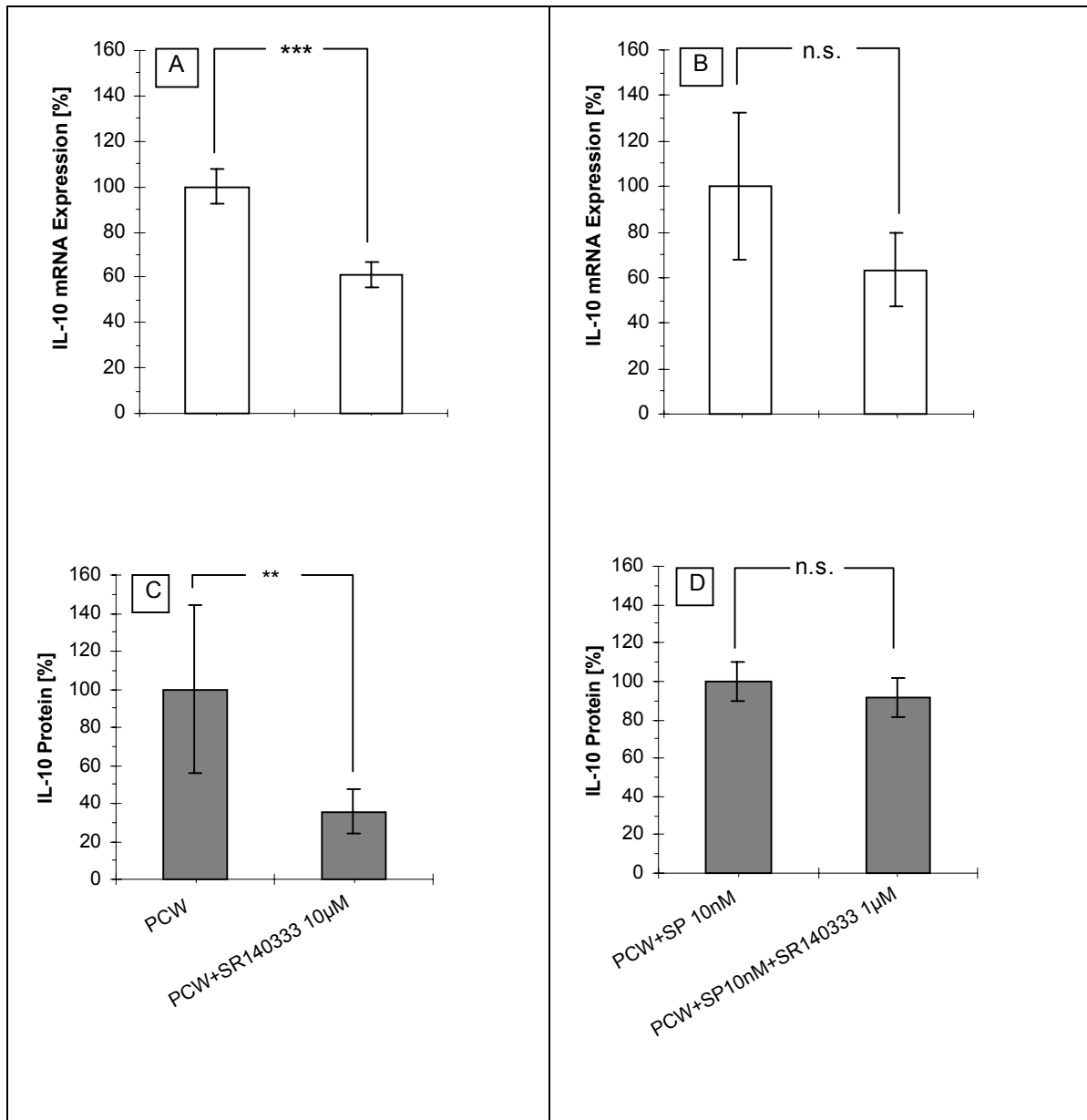


Abb. 20A-D: Wirkung von SR140333 auf die IL-10-mRNA-Expression (A, B) und IL-10-Proteinfreisetzung nach 8 h (C, D), n=4 aus 4 unabhängigen Experimenten, ***p<0,001; **p<0,01 gegenüber der mit PCW- bzw. PCW+SP 10 nM-stimulierten Gruppe

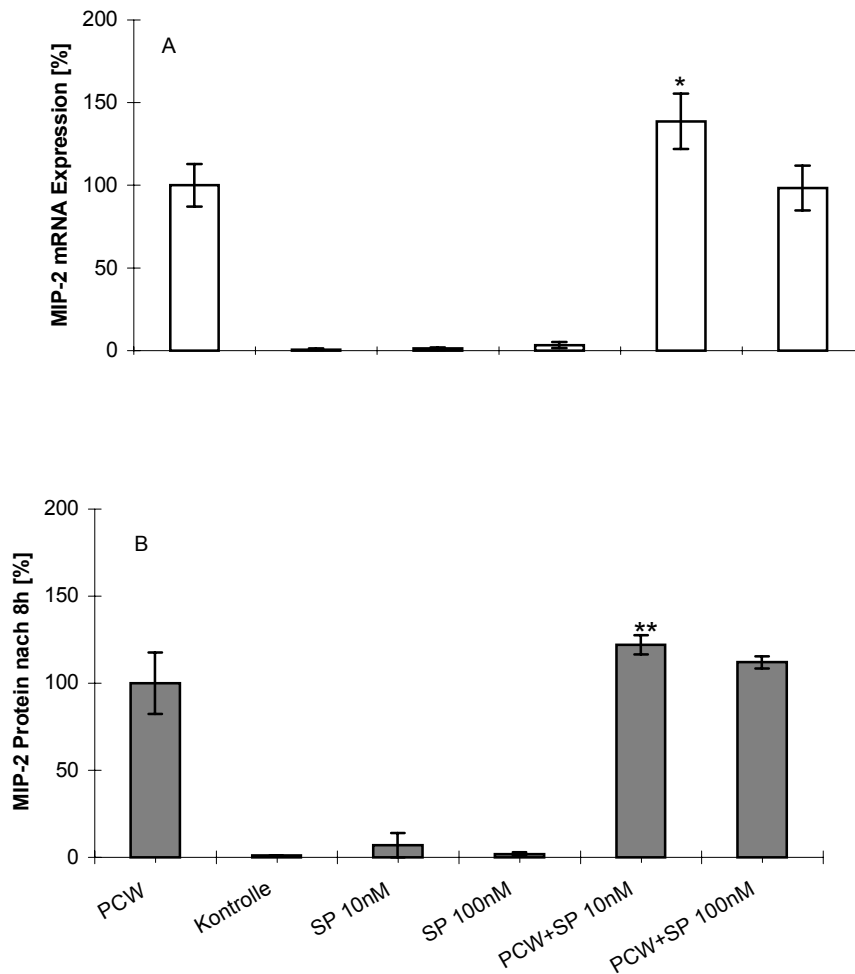


Abb. 21A-B: Wirkung von SP auf die MIP-2-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation (A) und MIP-2-Proteinfreisetzung nach 8 h (B), $n \geq 4$ von 4 unabhängigen Experimenten, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe

3.2.3. SP 1-4 N-terminales Fragment

Bei allen untersuchten Zytokinen wurde geprüft, ob SP₁₋₄ in den Konzentrationen 200 nM und 2000 nM einen Einfluss auf die Zytokin-mRNA-Expression sowie auf deren Freisetzung hat.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zu der PCW-induzierten Zytokin-Bildung gefunden werden.

3.3. CRLR (A-CGRP1) mRNA-Expression

Die Calcitonin Related-Like Receptor (CRLR)-mRNA entspricht der mRNA des CGRP-1 Rezeptors (siehe Einleitung).

Die CRLR-mRNA konnte sowohl bei den unstimulierten als auch bei den PCW-stimulierten zerebralen Kapillarendothelzellen nachgewiesen werden.

3.3.1. Einfluss von PCW auf die CRLR-mRNA-Expression im Zeitverlauf

Die mRNA-Expression des CRLR-Rezeptors wurde im zeitlichen Verlauf untersucht. So zeigte sich zum Zeitpunkt 0 h kein signifikanter Unterschied zwischen der PCW-Gruppe und der Kontrollgruppe, während sich nach 2 h die CRLR-Expression bei PCW-Stimulation gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte. Das Verhältnis der mRNA-Expression kehrte sich nach 4 h und 6 h um, dabei war die CRLR-mRNA-Expression stetig abgefallen und gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verringert (Abb.22A).

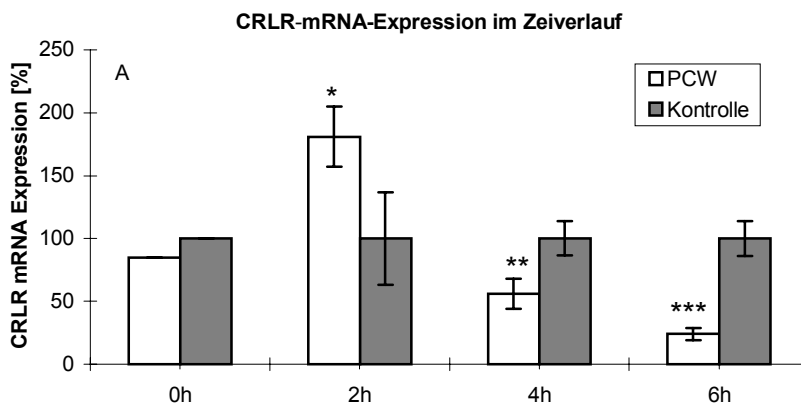


Abb. 22A: Zeitverlauf der CRLR mRNA-Expression bei PCW-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, (n=4), aus unabhängigen 4 Einzelexperimenten, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der Kontrolle

3.3.2. Regulation der CRLR mRNA-Expression bei PCW-Stimulation unter Zugabe von CGRP und CGRP₈₋₃₇ nach 4 h und 6 h

Nach 4 h war die CRLR-mRNA-Expression bei Zugabe von 10 nM CGRP gegenüber der PCW-Gruppe erhöht. Zusätzlich zu den 10 nM CGRP wurde 1 µM CGRP₈₋₃₇ zugegeben, dies bewirkte aber keine Inhibition der erhöhten mRNA-Expression.

Dagegen führte die alleinige Gabe von 1 µM CGRP₈₋₃₇ zu einer signifikanten Inhibition der PCW-induzierten CRLR mRNA-Expression.

Während die zusätzlichen Gaben von 1 nM und 10 nM CGRP zu PCW nach 6 h zu signifikant erhöhten CRLR-mRNA-Expressionen gegenüber der PCW Gruppe führten, bewirkte 100 nM CGRP keine signifikante Änderung. Insgesamt gesehen aber war die erhöhte mRNA-Expression gegenüber der Kontrollgruppe reduziert.

Die alleinige Stimulation mit 10 nM und 1 nM CGRP bewirkte nach 4 h und 6 h eine signifikante Reduktion der Expression gegenüber der Kontrollgruppe.

RDC-1 (K-CGRP1) Rezeptor

In den gleichen cDNA-Proben in denen die CRLR-Rezeptor-mRNA gemessen wurde, ist auch die RDC-1-Rezeptor mRNA nachgewiesen worden. Im Gegensatz zur CRLR-Rezeptor Transkription konnte hier keine Veränderung der Transkription unter Einfluss von PCW und CGRP gefunden werden.

L1-(Adrenomedullin)-Rezeptor

Ebenfalls konnte bei den gleichen Proben der L1-Rezeptor nachgewiesen werden. Allerdings ist die mRNA-Expression nur sehr schwach ausgeprägt und zeigte keinerlei Änderung der Transkription unter Einwirkung von PCW oder CGRP.

3.4. Adrenomedullin (AM)-mRNA-Expression

Die AM-mRNA konnte in allen untersuchten Proben, sowohl bei den unstimulierten- als auch bei den PCW-stimulierten Zellen nachgewiesen werden.

3.4.1. Einfluss von PCW auf die AM-mRNA-Expression im Zeitverlauf

Die AM-mRNA-Expression wurde im zeitlichen Verlauf untersucht. Während sich zum Zeitpunkt 0 h kein signifikanter Unterschied zwischen der PCW-Gruppe und der Kontrollgruppe fand, zeigte sich eine signifikant erhöhte AM mRNA-Expression nach 2 h, 4 h und 6 h (Abb.22B).

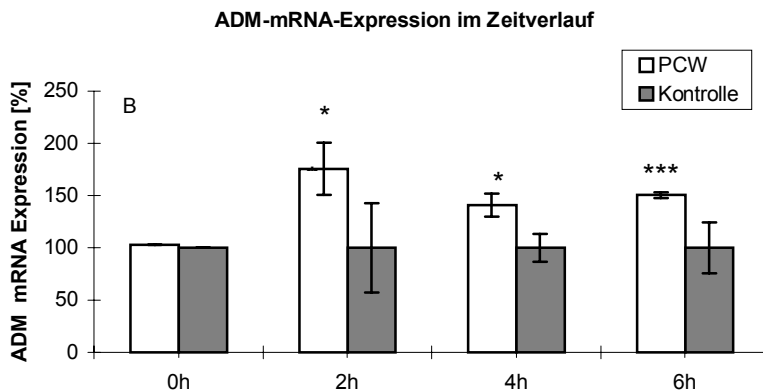


Abb. 22B: Zeitverlauf der AM-mRNA-Expression bei PCW-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle nach 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, (n=4) aus unabhängigen 4 Einzelexperimenten, *p<0,05, ***p<0,001 gegenüber Kontrolle

3.4.2. Regulation der AM-mRNA-Expression bei PCW-Stimulation und Zugabe von CGRP und CGRP₈₋₃₇ nach 4 h und 6 h

Die Zugabe von 10 nM CGRP führte nach 4 h und 6 h zu einer signifikanten Erhöhung der AM-mRNA-Expression, während die Zugabe von 1 und 100 nM CGRP keine signifikante Änderung der Transkription gegenüber dem PCW-Stimulus nach 6 h bewirkte (Abb. 23A).

Zusätzlich zu den 10 nM CGRP wurde 1 μ M CGRP₈₋₃₇ zugegeben, dies bewirkte eine signifikante Inhibition der erhöhten mRNA-Expression. Auch die alleinige Gabe von 1 μ M CGRP₈₋₃₇ führte zu einer signifikanten Inhibition der PCW-induzierten AM-mRNA-Expression nach 4 h (Abb. 23B,C).

Die alleinige Stimulation der Zellen mit 10 nM CGRP und 1 nM CGRP nach 4 h bzw. 6 h bewirkte im Trend eine erhöhte AM-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Abb. 23A).

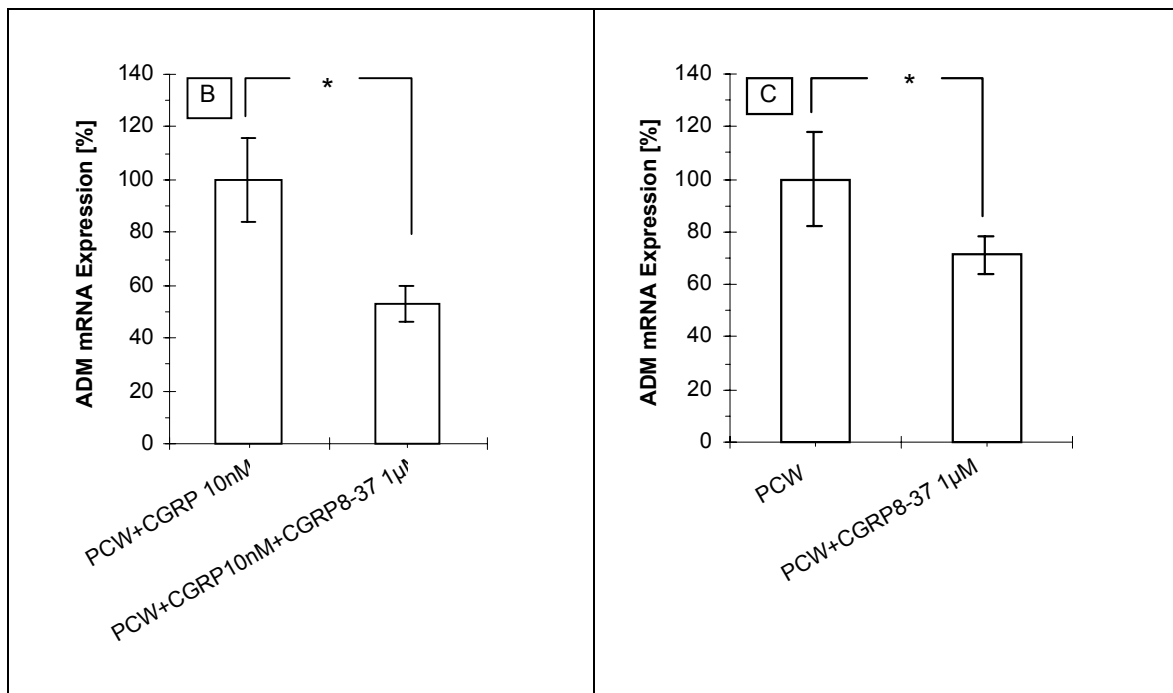
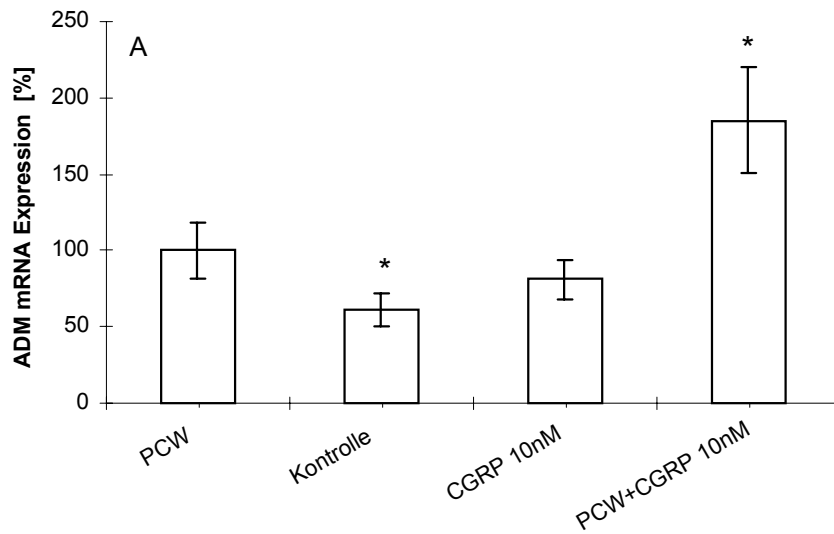


Abb. 23A-C: Wirkung von CGRP 10nM (A) und CGRP₈₋₃₇ 1 µM (B, C) auf die AM-mRNA-Expression nach 4 h Stimulation, n=4 aus 4 unabhängigen Einzelexperimenten, *p<0,05 gegenüber der mit PCW- bzw. PCW+CGRP 10 nM-stimulierten Gruppe

Tab. 6: Übersicht der CRLR- und AM-mRNA-Expression Ergebnisse

RNA %	PCW 0 h	KO 0 h	PCW 2 h	KO 2 h	PCW 4 h	KO 4 h	PCW 6 h	KO 6 h
CRLR	85	100	180,5 ± 24,4 *	100,0 ± 36,6	55,5 ± 12,5 **	100,0 ± 13,6	24,0 ± 4,7 ***	100,0 ± 13,8
AM	103,1	100	175,5 ± 25,1 *	100,0 ± 42,9	141,0 ± 11,1*	100,0 ± 13,4	150,4 ± 2,6 ***	100 ± 24,2

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,5 gegenüber der 100% Kontrolle (Ko)

Stimulanzen	CRLR 4 h %	CRLR 6 h %	AM 4 h %	AM 6 h %
PCW	100 ± 24,5	100 ± 29,7	100,0 ± 18,0	100,0 ± 24,8
Kontrolle	163,8 ± 13,0 ***	487,8 ± 43,2 ***	61,1 ± 11,4	66,7 ± 1,2 ***
CGRP 1 nM	n. b.	279,3 ± 8,2 # ***	n. b.	120,0 ± 35,5
CGRP 10 nM	70,0 ± 18,4 #	n. b.	81,0 ± 13,4	n.b.
PCW + CGRP 1 nM	n. b.	364,2 ± 82,7	n. b.	209,0 ± 48,4
PCW + CGRP10 nM	137,0 ± 9,1 *	174,0 ± 28,2	185,3 ± 34,9 *	131,7 ± 3,8 **
PCW + CGRP 100 nM	n. b.	194,5 ± 48,2	n. b.	108,0 ± 6,7
PCW + CGRP10nM + CGRP 8-37 1 µM	170,3 ± 30,0	n. b.	53,0 ± 6,6 *	n. b.
PCW + CGRP 8-37 1 µM	78,0 ± 6,4 *	n. b.	71,3 ± 7,1*	n. b.

#< 0,05 gegenüber der 100% Kontrolle, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,5 gegenüber 100% PCW-Stimulation

n.b. = nicht bestimmt

3.5. Einfluss von PCW und CGRP auf die Adrenomedullin (1-50) Protein-Freisetzung aus zerebralen Endothelzellen

Mit Hilfe des EIA wurde Adrenomedullin (1-50) zu den Zeitpunkten 0 h, 4 h, 8 h und 12 h gemessen.

Nach 0 h, 4 h, 8 h konnte kein Adrenomedullin(AM)-(1-50) gemessen werden. Erst nach 12 h konnte in den Gruppen, die mit 10 nM CGRP, PCW oder mit PCW und zusätzlich 10 nM CGRP stimuliert worden sind, AM (1-50) gemessen werden. Dabei bewirkte die zusätzliche Gabe von 10 nM CGRP zu PCW eine signifikante Erhöhung der AM-Konzentration gegenüber der mit PCW-Gruppe (Abb. 24A). Kein AM(1-50) war über den ganzen Zeitraum in den Überständen der Mediumkontrollen messbar.

Weiterhin wurde in den gleichen Proben in denen AM gemessen worden ist, auch der TNF- α Proteingehalt in pg/ml bestimmt. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der TNF- α -Konzentration und der AM-Konzentration nach 12 h. Bei der mit PCW-stimulierte Gruppe zeigte sich, dass eine erhöhte Konzentration an AM mit einer niedrigeren Konzentration an TNF- α korrelierte. Die verglichenen TNF- α -Konzentrationen waren dabei signifikant voneinander verschieden (Tab.7, Abb. 24A, B).

Tab. 7: Ergebnisse des Vergleichs zwischen TNF- α - und AM(1-50) Freisetzung

	TNF- α pg/ml				AM (1-50) ng/ml			
	0 h	4 h	8 h	12 h	0 h	4 h	8 h	12 h
PCW	0 \pm 0	30,3 \pm 20,6	122,8 \pm 12,6	195,5 \pm 19,0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	7,4 \pm 0
PCW + CGRP 10 nM	0 \pm 0	39,0 \pm 23,6	66,1 \pm 15,3 **	157,9 \pm 14,7 *	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	25,1 \pm 1,0 ***
CGRP 10 nM	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	2,8 \pm 0,0
Kontrolle	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 gegenüber der Stimulation mit PCW

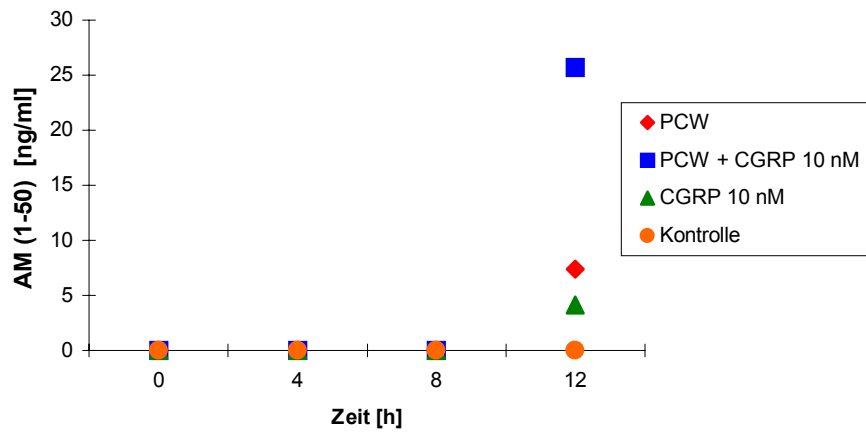
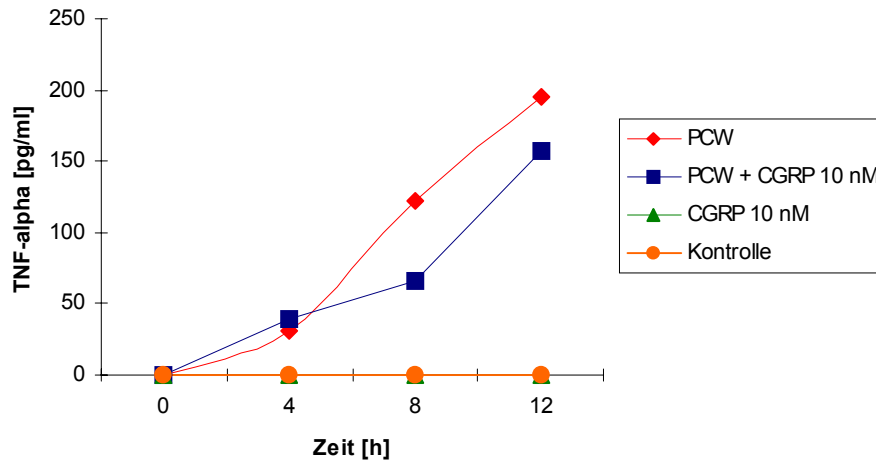


Abb. 24A-B: Zeitverlauf der Freisetzung von TNF- α (A) und AM 1-50 (B) aus zerebralen Endothelzellen nach Stimulation mit PCW, PCW+CGRP 10 nM, CGRP 10 nM und Kontrolle. Um die Übersichtlichkeit zu erhalten wurden der Standardabweichungen nicht dargestellt (siehe Tab 7); n \geq 2 aus 2 unabhängigen Experimenten

3.6. Vergleich der SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ (Fragment) Konzentrationen in den Zellkulturüberständen

In den Zellkulturüberständen wurde SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ mittels RIA gemessen. SP konnte nur in den mit SP stimulierten Proben gemessen werden. Die SP₁₋₁₁ Konzentrationen sind um das 2,3-fache höher als die SP₁₋₇ –Peptidkonzentrationen, wenn die Zellen mit 10 nM SP bzw. PCW und 10 nM SP stimuliert worden sind. Dabei blieb der prozentuale Anteil an SP₁₋₇ in den genannten Gruppen aber gleich. Bei einer zusätzlichen Gabe von 1 µM SR140333 zu der Stimulation mit nur 10 nM SP, zeigte sich nur ein geringer, 1,4-facher Unterschied zwischen der SP₁₋₁₁ und der SP₁₋₇ zu Gunsten von SP₁₋₁₁. Zusätzliche Gabe von 1 µM SR140333 zur Stimulation mit PCW und 10 nM SP bewirkte dagegen eine 3,1-fach höhere Konzentration an SP₁₋₁₁ im Vergleich zu der Konzentration an SP₁₋₇ (Tab. 8).

Tab. 8: SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ Protein (fmol/100µl) in Zellkulturüberständen

SP-Fragment	PCW	Ko	SP 10 nM	PCW+SP 10 nM	SP 10 nM + SR140333 1 µM	PCW+SP 10nM+ SR140333 1µM	SP 100 nM	PCW+SP 100nM
SP ₁₋₁₁ (fmol/100µl)	0 ± 0	0 ± 0	159,2 ± 27,3	279,0 ± 55,8	194,7 ± 27,5	197,5 ± 56,2	~308x10 ³ ± ~131x10 ³	~355x10 ³ ± ~162x10 ³
SP ₁₋₇ (fmol/100µl)	0 ± 0	0 ± 0	71,0 ± 5,3	118,0 ± 45,4	136,5 ± 22,4	63,0 ± 20,1	403,0 ± 132,3	797,0 ± 214,6

Obwohl immer mit der gleichen Menge an SP₁₋₁₁ stimuliert worden ist, war die Konzentration von SP₁₋₁₁ in den Überständen, die mit PCW und 10 nM SP stimuliert worden sind, gegenüber den Proben, denen nur 10 nM SP zugegeben worden ist, signifikant erhöht. Das Verhältnis der SP₁₋₇ Konzentrationen in den oben genannten Proben zueinander entsprach in der Tendenz dem Konzentrationsverhältnis von SP₁₋₁₁, war jedoch nicht signifikant verschieden. Die SP₁₋₇ Konzentration in den Überständen, denen PCW und 100 nM SP zugegeben worden sind, war gegenüber den Überständen denen nur 100 nM SP zugegeben sind signifikant erhöht. In den Proben mit zusätzlicher Gabe von 1 µM SR140333 waren die SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ Konzentrationen in den Überständen gegenüber den Proben die ohne Zugabe von SR140333 zu PCW und 10 nM SP stimuliert worden sind, signifikant verringert. (Abb.25A, B).

Der Vergleich zwischen den einzelnen Konzentrationen von SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ der stimulierten Proben erfolgt in Prozent. Dabei werden die Werte auf die Gruppe der Stimulation mit PCW+SP10nM = 100% bzw. PCW+SP100nM =100% (nur SP₁₋₇) bezogen (Abb. 25 A, B).

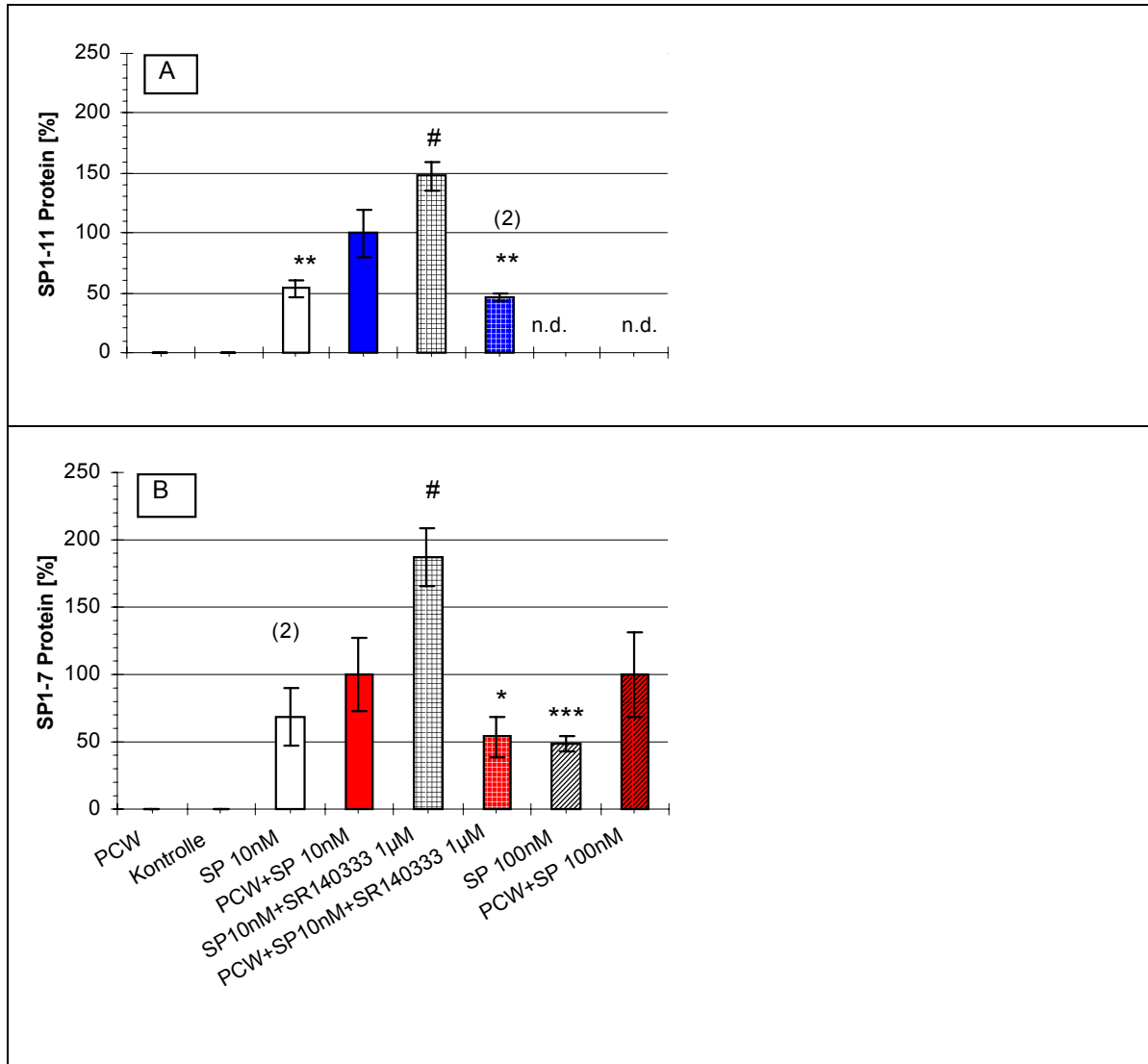


Abb. 25A-B: SP1-11 (A) und SP1-7 (B)-Peptid in Überständen der stimulierten Proben (s.o.) mit dem RIA gemessen, n=3 (Ausnahme Zahlen in Klammern über den Säulen) aus 3 unabhängigen Einzelerperimenten **A:** **p<0,01 gegenüber 100% PCW+SP10nM; #p<0,05 gegenüber SP10nM; **B:** *p<0,05 gegenüber 100% PCW+SP10nM bzw. PCW+SP10nM+SR140333 1µM; # p<0,05 gegenüber SP100nM; ***p<0,001 gegenüber 100% PCW+SP100nM

Tab. 9: Zusammenfassende Übersicht der Daten über den Einfluss von CGRP und SP auf die Bildung der Zytokine

RNA in %	TNF- α %		IL-1 β %	IL-6%	IL-10%	MIP-2%
PCW	100,0 \pm 26,9		100,0 \pm 21,8	100,0 \pm 14,4	100,0 \pm 24,2	100,0 \pm 24,3
Kontrolle	3,6 \pm 0,9		1,2 \pm 0,7	0,6 \pm 0,3	7,4 \pm 2,4	3,8 \pm 1,3
CGRP1nM	3,3 \pm 1,4		2,3 \pm 1,6	0,5 \pm 0,1	7,3 \pm 1,6	1,7 \pm 0,3
CGRP10nM	0,5 \pm 0,3#		1,8 \pm 1,1	0,1 \pm 0,0	2,1 \pm 1,5	3,8 \pm 0,9
CGRP100nM	3,0 \pm 1,1		1,3 \pm 0,4	0,3 \pm 0,1	2,5 \pm 1,1	2,1 \pm 0,6
PCW+CGRP1nM	199,6 \pm 30,3**		134,0 \pm 15,8 *	123,0 \pm 8,7 *	127,0 \pm 6,7 **	252,6 \pm 49,6 *
PCW+CGRP10nM	207,9 \pm 28,1***		135,8 \pm 6,5 ***	153,7 \pm 12,6 **	161,5 \pm 21,8 *	356,2 \pm 90,5 *
PCW+CGRP100nM	183,3 \pm 35,2*		112,5 \pm 8,6	133,2 \pm 8,6 **	130,8 \pm 13,5	355,2 \pm 105,1 *
PCW+CGRP10nM+ CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	62,5 \pm 4,7 ***(a)		74,0 \pm 5,9 **(a)	66,9 \pm 8,7 **(a)	61,0 \pm 5,6 ***(a)	59,6 \pm 6,1 ***(a)
PCW+CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	106,1 \pm 22,6		106,4 \pm 8,7	98,2 \pm 26,1	63,2 \pm 16,2	89,8 \pm 12,3
Protein in %	TNF- α 4 h %	TNF- α 8 h %	IL-1 β %	IL-6%	IL-10%	MIP-2%
PCW	100,0 \pm 18,0	100,0 \pm 33,0	100,0 \pm 33,0	100,0 \pm 11,4	100,0 \pm 36,3	100,0 \pm 26,7
Kontrolle	0,8 \pm 0,2	1,5 \pm 0,5	4,0 \pm 2,4	4,0 \pm 2,4	0,3 \pm 0,3	2,7 \pm 0,7
CGRP1nM	0,6 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	1,7 \pm 0,9	1,7 \pm 0,9	2,5 \pm 2,2	1,6 \pm 0,7
CGRP10nM	0,6 \pm 0,1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
CGRP100nM	0,7 \pm 0,1	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
PCW+CGRP1nM	154,5 \pm 13,9 ***	60,4 \pm 6,9 ***	109,0 \pm 27,2	111,0 \pm 6,4	123,0 \pm 18,8	105,0 \pm 15,5
PCW+CGRP10nM	145,8 \pm 13,7 *	63,4 \pm 10,3 **	158,0 \pm 16,7*	134,0 \pm 14,7 *	165,0 \pm 16,4 **	143,0 \pm 10,3 **
PCW+CGRP100nM	135,3 \pm 20,6	82,7 \pm 9,3	112,4 \pm 27,9	110,0 \pm 7,7	146,0 \pm 6,0 *	105,0 \pm 30,8
PCW+CGRP10nM + CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	74,2 \pm 9,2 *(a)	122,7 \pm 22,9	68,0 \pm 7,2 **(a)	80,0 \pm 8,0 * (a)	77,6 \pm 5,1 **(a)	78,2 \pm 3,9 ***(a)
PCW+CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	34,1 \pm 7,0 ***	38,2 \pm 9,5 ***	86,0 \pm 4,4 *	62,9 \pm 5,2 ***	70,5 \pm 8,0 **	85,2 \pm 6,0 *

RNA	TNF- α		IL-1 β	IL-6	IL-10	MIP-2
	Units		Units	Units	Units	Units
PCW	252,9 \pm 68,1		515,3 \pm 112,7	1252,2 \pm 180,3	1282,8 \pm 310,3	394,3 \pm 95,7
Kontrolle	4,7 \pm 0,8					
CGRP1nM	4,7 \pm 1,6					
CGRP10nM	0,8 \pm 0,3					
CGRP100nM	3,5 \pm 1,2					
PCW+CGRP1nM	455,5 \pm 150,7		670,6 \pm 194,3	1546,2 \pm 251,0	1629,6 \pm 387,0	875,3 \pm 187,5
PCW+CGRP10nM	494,6 \pm 157,8		691,8 \pm 160,2	1929,0 \pm 325,4	2060,8 \pm 489,1	1244,2 \pm 314,0
PCW+CGRP100nM	485,3 \pm 212,5		589,0 \pm 307,9	1578,6 \pm 218,5	1575,5 \pm 492,9	1231,5 \pm 370,0
PCW+CGRP10nM + CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	183,3 \pm 35,3		421,0 \pm 162,0	1256,0 \pm 101,6	1325,0 \pm 564,8	419,0 \pm 150,2
PCW+CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	572,0 \pm 368,2		708,5 \pm 111,3	990,5 \pm 327,8	1754,0 \pm 438,1	277,6 \pm 86,0
Protein	TNF- α 4 h	TNF- α 8 h	IL-1 β	IL-6	IL-10	MIP-2
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml
PCW	1116,3 \pm 209,0	1830,0 \pm 600,8	234,0 \pm 77,3	3972,0 \pm 452,8	1010,0 \pm 367,0	86,0 \pm 23,0
Kontrolle						
CGRP1nM						
CGRP10nM			n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
CGRP100nM			n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
PCW+CGRP1nM	1801,5 \pm 468,2	1024,0 \pm 283,4	178,0 \pm 29,5	4110,0 \pm 470,1	1253,0 \pm 519,9	84,0 \pm 19,7
PCW+CGRP10nM	1706,0 \pm 477,3	1161,4 \pm 472,3	388,0 \pm 85,8	5111,0 \pm 387,9	1591,0 \pm 599,9	121,0 \pm 30,3
PCW+CGRP100nM	1681,7 \pm 528,8	782,0 \pm 219,5	156,0 \pm 28,5	3738,0 \pm 410,2	584,0 \pm 316,5	61,0 \pm 13,3
PCW+CGRP10nM + CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	1165,8 \pm 340,0	1247,7 \pm 484,7	318,0 \pm 42,9	3866,4 \pm 1215,0	1351,0 \pm 407,4	71,8 \pm 14,5
PCW+CGRP ₈₋₃₇ 1 μ M	137,0 \pm 53,2	169,0 \pm 20,2	232,0 \pm 12,0	4577,8 \pm 1135,0	460,8 \pm 56,0	84,9 \pm 7,3

RNA in %	TNF-α %		IL-1β%	IL-6%	IL-10%	MIP-2%
PCW	100,0 \pm 24,0		100,0 \pm 20,1	100,0 \pm 12,0	100,0 \pm 18,3	100,0 \pm 13,0
Kontrolle	9,4 \pm 1,0		10,5 \pm 4,5	5,2 \pm 2,0	7,0 \pm 1,2	0,8 \pm 0,4
SP10nM	10,5 \pm 2,0		12,1 \pm 4,5	10,6 \pm 3,0 #	4,0 \pm 1,4	4,3 \pm 3,1
SP100nM	10,7 \pm 3,0		15,1 \pm 6,8	12,5 \pm 5,0	6,0 \pm 1,8	3,3 \pm 1,8
SP10nM+SR140333 1 μ M	16,7 \pm 7,0		5,4 \pm 2,0	5,7 \pm 3,0	2,0 \pm 0,8	2,1 \pm 1,1
PCW+SP10nM	116,7 \pm 14,0		117,2 \pm 5,5 *	130,5 \pm 12,2 *	123,0 \pm 33,4	138,7 \pm 16,7*
PCW+SP100nM	115,0 \pm 7,0		99,8 \pm 5,8	139,0 \pm 19,0	125,0 \pm 42,6	98,4 \pm 13,5
PCW+SP10nM + SR140333 1 μ M	135,4 \pm 17,0		91,4 \pm 5,6	98,7 \pm 12,6	52,0 \pm 5,1***(b)	77,3 \pm 9,7
PCW +SR140333 10 μ M	178,8 \pm 24,0*		92,4 \pm 9,7	54,3 \pm 10,1 **	36,0 \pm 8,9 ***	74,3 \pm 12,7
Protein in %	TNF-α 4 h %	TNF-α 8 h %	IL-1β%	IL-6%	IL-10%	MIP-2%
PCW	100,0 \pm 19,6	100,0 \pm 20,3	100,0 \pm 19,3	100,0 \pm 13,5	100,0 \pm 32,5	100,0 \pm 17,6
Kontrolle	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	2,0 \pm 2,4	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,3	2,0 \pm 0,7
SP10nM	0,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2	4,0 \pm 3,6	2,0 \pm 1,0 #	0,8 \pm 0,6	2,0 \pm 0,7
SP100nM	2,0 \pm 1,4	2,0 \pm 0,5	1,0 \pm 0,9	5,0 \pm 4,9	0,0 \pm 0,0	2,0 \pm 0,9
SP10nM+SR140333 1 μ M	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,5	0,0	0,2 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,2
PCW+SP10nM	62,0 \pm 7,8 ***	117,0 \pm 14,4	120,0 \pm 10,7	106,0 \pm 5,6	118,5 \pm 8,3	122,0 \pm 5,5 ***
PCW+SP100nM	105,0 \pm 22,8	123,0 \pm 25,1	119,0 \pm 2,5 *	97,0 \pm 6,7	125,5 \pm 22,9	112,0 \pm 3,6 **
PCW+SP10nM+ SR140333 1 μ M	91,0 \pm 17,4	70,0 \pm 5,7**(b)	105,0	103,0 \pm 6,9	93,3 \pm 9,9	107,0 \pm 9,0
PCW+SR140333 10 μ M	18,0 \pm 6,2 ***	36,0 \pm 10,0***	193,0	46,0 \pm 7,1 ***	35,7 \pm 11,5**	99,0 \pm 17,1

RNA in Units	TNF- α		IL-1 β	IL-6	IL-10	MIP-2
	Units		Units	Units	Units	Units
PCW	684,1 \pm 162,0		672,0 \pm 135,6	971,0 \pm 114,0	1936,0 \pm 354,0	255,1 \pm 33,3
Kontrolle	65,9 \pm 20,0		52,0 \pm 17,0	48,4 \pm 14,0	92,0 \pm 34,8	2,4 \pm 1,5
SP 10 nM	71,6 \pm 22,0		63,0 \pm 18,0	102,6 \pm 28,0	72,0 \pm 29,4	4,3 \pm 3,1
SP 100 nM	100,3 \pm 34,0		78,0 \pm 27,0	115,3 \pm 42,0	110,0 \pm 34,7	10,3 \pm 7,4
SP10nM+SR140333 1 μ M	146,5 \pm 50,0		50,0 \pm 28,7	44,7 \pm 19,0	26,0 \pm 12,7	3,7 \pm 1,3
PCW+SP 10 nM	806,5 \pm 183,0		681,0 \pm 113,1	1289,0 \pm 234,0	2113,0 \pm 532,1	345,8 \pm 83,7
PCW+SP 100 nM	780,2 \pm 204,0		684,8 \pm 176,3	1408,2 \pm 407,0	2257,0 \pm 685,9	250,4 \pm 45,5
PCW+SP 10nM + SR140333 1 μ M	1096,8 \pm 357,0		702,3 \pm 103,9	979,0 \pm 126,0	1087,0 \pm 358,1	182,3 \pm 33,3
PCW +SR140333 10 μ M	1048,6 \pm 331,0		673,0 \pm 88,3	434,6 \pm 62,0	452,0 \pm 115,9	149,8 \pm 22,0
Protein	TNF- α 4h	TNF- α 8h	IL-1 β	IL-6	IL-10	MIP-2
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml
PCW	1369,0 \pm 268,3	605,0 \pm 122,6	126,0 \pm 24,0	4053,0 \pm 547,7	517,7 \pm 168,7	103,0 \pm 18,1
Kontrolle	6,0 \pm 1,4	7,0 \pm 1,4	6,0 \pm 6,3	0,0 \pm 0,0	1,3 \pm 1,3	2,0 \pm 0,5
SP 10 nM	5,0 \pm 1,0	6,0 \pm 0,8	7,0 \pm 7,0	67,0 \pm 33,9	0,8 \pm 0,6	2,0 \pm 0,4
SP 100 nM	16,0 \pm 10,7	5,0 \pm 0,3	5,0	139,0 \pm 116,4	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,4
SP10nM+SR140333 1 μ M	4,0 \pm 1,1	5,0 \pm 0,3	0,0	15,0 \pm 15,0	0,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,3
PCW+SP 10 nM	842,0 \pm 7,8	711,0 \pm 155,4	153,0 \pm 35,5	4514,0 \pm 5,6	576,6 \pm 164,5	125,0 \pm 24,9
PCW+SP 100 nM	1484,0 \pm 372,1	494,0 \pm 180,8	180,0 \pm 46,0	4118,0 \pm 971,8	544,8 \pm 200,1	123,0 \pm 30,7
PCW+SP10 nM + SR140333 1 μ M	971,0 \pm 409,3	393,0 \pm 170,6	236,0	5120,0 \pm 958,2	548,4 \pm 194,4	173,0 \pm 34,9
PCW+SR140333 10 μ M	104,0 \pm 25,0	161,0 \pm 82,0	378,0	2572,0 \pm 848,1	256,6 \pm 189,1	146,0 \pm 38,8

Anmerkungen: ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 signifikant gegenüber der mit PCW stimulierten Gruppe, (a) signifikant gegenüber der mit PCW+CGRP 10 nM-stimulierten Gruppe, (b) signifikant gegenüber der mit PCW+SP 10 nM-stimulierten Gruppe, #p<0,05 signifikant gegenüber der Kontrolle

4.0. Diskussion

Schwerpunkt dieser Arbeit war es, an primären zerebralen Kapillarendothelzellen, einem wesentlichen zellulären Bestandteil der BHS, den Einfluss der Neuropeptide CGRP und SP auf die mRNA-Expression und Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Effekt von Zellwänden von *S. pneumoniae* auf die Regulation der mRNA-Expression des Calcitonin Related-Like Receptor (CRLR), der als CGRP- und AM-Rezeptor funktioniert, untersucht.

In eigenen von mir hier nicht weiter ausgeführten Untersuchungen konnten ich zeigen, dass zerebrale Endothelzellen nicht in der Lage sind, CGRP zu exprimieren. Deshalb untersuchten wir, ob zerebrale Endothelzellen AM sezernieren können. Wir untersuchten auch, wie sich die Dichte an NK-Rezeptoren auf die zerebralen Endothelzellen unter dem Einfluss von PCW verändert und ob die Stimulation der Zellen mit PCW sich auf die Fragmentierung von SP₁₋₁₁ zu SP₁₋₇ auswirkt.

Dabei ergaben sich folgende wesentliche Resultate:

1. CGRP führte zu einer Erhöhung der PCW-induzierten TNF- α -, IL-1 β -, IL-6-, IL-10- und MIP-2-mRNA-Expression und führte zu einer erhöhten Freisetzung der Zytokine mit Ausnahme von TNF- α . Hierbei war die Freisetzung aus den zerebralen Endothelzellen nach 8 h reduziert. Die Wirkung von CGRP ist Rezeptor-vermittelt, da eine erhöhte Expression der Zytokine durch Zugabe des Antagonisten h-CGRP₈₋₃₇ kompetitiv gehemmt werden konnte.
2. Der Einfluss von SP auf die Expression der Zytokine war insgesamt schwächer, eine erhöhte mRNA-Expression war nur für IL-1 β , IL-6 und MIP-2 statistisch signifikant. SP führte zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1 β und MIP-2 nach 8 h, während die Freisetzung von TNF- α gegenüber den PCW-stimulierten Proben nach 4 h signifikant reduziert war. Die Proteinfreisetzung von TNF- α , IL-6 und IL-10 konnte zudem durch den „Non-Peptide“ NK-1-Antagonisten SR140333 gehemmt werden, nicht aber die Freisetzung von IL-1 β und MIP-2.
3. Das N-terminale SP-Fragment SP₁₋₄ war nicht in der Lage die Zytokin-mRNA-Expression und -Freisetzung aller untersuchter Zytokine und MIP-2 zu beeinflussen.

4. Eine konstitutive mRNA-Expression von CRLR und AM war in den zerebralen Endothelzellen nachweisbar. Zellwände von *S. pneumoniae* regulierten die mRNA-Expression von CRLR und AM im zeitlichen Verlauf.
5. CGRP führte allein zu einer Reduzierung der CRLR-mRNA-Expression und zu einer Erhöhung der AM-mRNA-Expression und AM(1-50)-Freisetzung. In Anwesenheit von PCW führte CGRP zu einer weiteren Erhöhung der CRLR- und AM- Expression gegenüber der alleinigen PCW-Stimulation.
6. Mittels Enzym-Immuno-Assay (EIA) war AM(1-50) Protein nur in Überständen von CGRP- bzw. PCW-stimulierten Proben messbar. In Gegenwart von CGRP war bei den PCW-stimulierten Proben die AM(1-50) Proteinkonzentration signifikant erhöht.
7. Ein Vergleich zeigte, dass mit verstärkter Freisetzung von AM(1-50) die TNF- α - Freisetzung signifikant vermindert war.
8. Die Detektion von SP war mittels RIA in den Zellkulturüberständen der Kontrollen und in den PCW-Proben nicht möglich. Bei Zugabe von SP₁₋₁₁ konnten erhöhte Konzentrationen an SP₁₋₇ bei den PCW-Proben gemessen werden, jedoch führte die PCW-Stimulation nicht zu einer vermehrten SP-Spaltung.

In den folgenden Abschnitten sollen die Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden.

4.1. Einfluss von CGRP auf die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch CGRP die PCW-induzierte TNF- α -, IL-1 β -, IL-6-, IL-10- und MIP-2-mRNA-Expression in zerebralen Endothelzellen verstärkt wird. Die durch CGRP-verstärkte mRNA-Expression konnte komplett durch den CGRP-1-Rezeptor-Antagonist hCGRP₈₋₃₇ auf das Niveau der PCW-induzierten mRNA-Expression reduziert werden. Dagegen konnte die gleichzeitige Gabe von hCGRP₈₋₃₇ zu PCW die induzierte Zytokin-Expression nicht hemmen. CGRP hingegen hatte allein keinen Einfluss auf die basale Expression und Freisetzung der untersuchten Zytokine und MIP-2.

Im wesentlichen korrelierten die Effekte von CGRP auf die Freisetzung der Zytokine mit den Effekten auf die mRNA-Expression. So zeigte sich eine ca. 50 % höhere Proteinfreisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 nach 8 h bzw. von TNF- α nach 4 h Inkubation.

Der wohl auffälligste Effekt von CGRP war aber die Inhibition der Freisetzung des bioaktiven TNF- α nach 8 h Inkubation. So waren die gemessenen TNF- α -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen um ca. 40 % im Vergleich zu den Proben, die nur mit PCW stimuliert worden sind, reduziert.

Während für IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2 sowie TNF- α nach 4 h die erhöhte Freisetzung durch die Gabe von hCGRP₈₋₃₇ gehemmt werden konnte, war dies bei der Freisetzung von bioaktiven TNF- α nach 8 h nicht der Fall. Im Gegenteil, es zeigte sich im Trend sogar ein umgekehrter Effekt: der Gehalt an TNF- α lag um ca. 20 % höher als bei Stimulation mit 10 nM CGRP.

Die alleinige Gabe von hCGRP₈₋₃₇ zu PCW hemmte die induzierte Freisetzung von Zytokinen. Am stärksten war der Gehalt an freiem bioaktiven TNF- α , um ca. 70 %, reduziert.

Interessanterweise gelang es nicht, die mRNA von CGRP in den zerebralen Endothelzellen nachzuweisen. Demzufolge bleibt die Frage offen, warum die direkte Zugabe von h-CGRP₈₋₃₇ zu PCW die Freisetzung der Zytokine derartig stark hemmt, wenn kein CGRP von den Zellen gebildet wird und auch kein CGRP zugegeben wurde. Vermutet werden kann eine Inhibition des AM-Signals am CRLR-Rezeptor. Mehr dazu soll unter Abschnitt 4.4. diskutiert werden.

Die Aktivierung der zerebralen Kapillarendothelzellen ist ein wesentlicher Schritt in der inflammatorischen Kaskade der Meningitis. Eine wichtige Rolle dabei spielt TNF- α , da es in den zerebralen Endothelzellen gebildet wird und über autokrine Aktivierung u.a. zur Hochregulierung der ICAM-1-Adhäsionsmoleküle führt. Die TNF- α -Produktion der zerebralen Endothelzellen und die daraus folgende entzündliche Aktivierung der Zellen ist die Voraussetzung für die vom PAF-Rezeptor vermittelte Transzytose von Pneumokokken. Später wiederum spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle bei der Invasion von aktivierten Leukozyten in das ZNS [Springer et al., 1990]. Diese aktivierten Leukozyten tragen wesentlich zum Schaden bei der bakteriellen Meningitis bei [Tuomanen et al., 1989; Weber et al., 1995; Braun et al., 1999]. Auch die Höhe der Leukozytenzahl im Liquor von Patienten im akuten Stadium der bakteriellen Meningitis korrelierte mit der Schwere der chronischen Folgen der Erkrankung [Bohr et al., 1984].

Wie bereits erwähnt, konnte von uns gezeigt werden, dass mit PCW-stimulierte zerebrale Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle einen deutlichen Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression, mit einem Maximum nach 2-4 h, erreichen. Die Expression fiel

dann kontinuierlich wieder ab. Der Verlauf der Transkription spiegelt sich in etwa im Verlauf der TNF- α -Freisetzung wider. So konnten wir zeigen, dass die maximale TNF- α -Konzentration im Überstand unter den gewählten Reaktionsbedingungen *in-vitro* nach ca. 8 h erreicht wird und danach wieder abfällt [Freyer et al., 1999]. Der Rückgang des biologisch aktiven TNF-Proteins wird unter anderem durch die Bindung an den löslichen TNF-Rezeptor erklärt. In der Literatur findet man als Erklärung häufig, dass es mit der Synthese von TNF- α auch zur Synthese von löslichem TNF-Rezeptor kommt [Aloisi, 1995; Bebo & Linthicum, 1995]. Jedoch erlaubt dieses keinen Rückschluss auf den Rückgang der Höhe des TNF-mRNA-Signals. Es muss zumindest zu einem Teil auch auf eine Herabregulierung („Downregulation“) der Transkription geschlossen werden.

Wie CGRP zusätzlich auf die Regulation der mRNA-Expression Einfluss nimmt, ist bisher völlig unklar. Einen Schlüssel zum Verständnis der Prozesse könnten folgende Beobachtungen sein. Bei Endothelzellen haben de Martin et al. [1993] gefunden, dass durch LPS, TNF- α und IL-1 β neben NF κ B (Nuclear Factor κ B) auch I κ B induziert wird. Während NF κ B ein transkriptioneller Aktivator ist, wird diese transkriptionelle Aktivierung durch I κ B verhindert. Durch eine Assoziation von NF κ B mit I κ B ist keine Bindung an die DNA mehr möglich. Außerdem vermuten sie auf Grund ihrer Untersuchungen, dass NF κ B selbst den Inhibitor I κ B im Sinne eines negativen Feedbacks induziert. Drei wesentliche Erkenntnisse über die Signaltransduktion von grampositiven bakteriellen Bestandteilen sind erst kürzlich gemacht worden. So konnten Yoshimura et al. [1999] zeigen, dass grampositive Bestandteile über den Toll-like-Rezeptor 2 erkannt werden und dass durch die Rezeptorinteraktion eine Signaltransduktion erfolgt. Kurz zuvor war von Schumann et al. [1998] gezeigt worden, dass sowohl LPS als auch PCW bei Astrozyten zu einer abhängigen Aktivierung von MAP-Kinasen führen. Eine Blockierung der MAP-Kinasen Erk-1/-2 oder p38 führte zu einer signifikanten Verminderung der TNF-Produktion, was für einen möglichen Zusammenhang zwischen MAP-Kinase-Aktivierung und TNF-Transkription spricht. Eine mögliche Verbindung zwischen Toll-like-Rezeptoren und MAP-Kinase-Aktivierung über MEKK1 (und NF κ B Aktivierung) konnte erst vor kurzem als ECSIT-Protein („ evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways“) von Kopp et al. [1999] identifiziert werden.

Bezüglich der Signaltransduktion von CGRP in zerebralen, isolierten Arteriolen konnte von Edwards et al. [1991] gezeigt werden, dass CGRP zu einer dosisabhängigen

cAMP-Akkumulation führt. Durch Zugabe des Antagonisten hCGRP₈₋₃₇ konnte die cAMP-Produktion gehemmt werden. Weiterführende kürzliche Untersuchungen haben ergeben, dass CGRP in „human embryonic kidney“ (HEK) 293 Zellen über den CGRP-1 (CRLR)-Rezeptor zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Kaskade >Proteinkinase A (PKA)> MAP-Kinasen, (erk1/2) und p38 zeit- und dosisabhängig führte [Parameswaran et al., 2000]. Das CGRP auch in der Lage ist, auf die Aktivierung bzw. Inhibition des NFκB-Faktors einzuwirken, ist erst kürzlich in Thymozyten von Millet et al. [2000] nachgewiesen worden. Eine Regulation des NFκB-Faktors durch CGRP in den zerebralen Endothelzellen würde erklären, warum es durch zusätzliche Applikation von CGRP zu PCW zunächst zu einer schnellen und verstärkten mRNA-Expression der Zytokine TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 und MIP-2 gegenüber alleiniger Stimulation mit PCW kommt und anschließend zu einer Reduktion, insbesondere der Konzentration an bioaktiven TNF-α im Überstand nach 8 h Inkubation, führt. Es wäre auch eine Erklärung für die nicht-selektive Wirkung von CGRP auf einzelne Zytokine, da für alle untersuchten Zytokine ähnliche „upstream“ liegende regulatorische Sequenzen (z.B. Bindungsstellen für NFκB) beschrieben worden sind [Thompson, 1994]. Es wäre auch vorstellbar, dass bei einem bestimmten Pathomechanismus eine gleichzeitige Induktion verschiedener Gene vorkommt und diese dann gleichzeitig von CGRP durch Änderung des Aktivierungszustandes von NFκB reguliert werden könnten.

Eine andere Erklärung wäre, dass CGRP den löslichen Rezeptor hochreguliert und damit das bioaktive TNF abnimmt.

In weiteren Untersuchungen konnte ich erstmals feststellen, dass die CGRP-1 (CRLR)-Rezeptor mRNA-Expression durch PCW nach 2 h um das 1,8-fache gegenüber der Kontrolle hochreguliert wird, aber um das 2-fache bereits nach 4 h und sogar um das 4-fache nach 6 h im Vergleich zur Kontrolle niedriger lag. Das zeigte zudem, dass die Regulation des CRLR durch PCW zeitlich mit der Induktion der Zytokine zusammenfiel. CGRP stabilisierte in meinen Experimenten die CRLR-Transkription im Vergleich zur Stimulation mit PCW auf einem höherem Niveau.

Auf Grund meiner Ergebnisse scheint CGRP unterschiedliche Rollen in der Entzündungskaskade zu spielen. CGRP wirkt proinflammatorisch in der Frühphase der endothelialen Entzündungsreaktion, später hingegen überwiegt eine immunmodulatorische Aktivität. Da CGRP auch die IL-10-mRNA-Expression und -Freisetzung verstärkt, besteht auch die Möglichkeit, dass durch IL-10 wiederum verstärkt die Freisetzung von TNF-α

gehemmt wird. Von IL-10 ist bekannt, dass es in humanen Monozyten über die Inhibition von NF κ B die TNF- α -Produktion hemmt [Wang et al., 1995].

Insgesamt gibt es bisher nur wenige Arbeiten, die den Einfluss von CGRP hinsichtlich der Expression und Freisetzung von Zytokinen untersucht haben. In den meisten Arbeiten wurde vor allem die Wirkung von CGRP auf die Freisetzung zu einem Zeitpunkt untersucht, sodass oft kein direkter Vergleich mit meinen Ergebnissen sinnvoll ist.

Ähnlich konnte ein inhibitorischer Effekt von CGRP auf die TNF- α -Freisetzung bei Stimulation mit LPS an kultivierten fetalen Osteoblasten der Ratte bereits nach 3 h, bei kultivierten Peritonealmakrophagen der Maus und bei humanen Vollblutzellen nach 24 h beobachtet werden. Dabei war die TNF- α -Proteinkonzentration zwischen 50 % und 24 % gegenüber alleiniger LPS-Stimulation reduziert. In allen untersuchten Zellsystemen konnte der inhibitorische Effekt durch hCGRP₈₋₃₇ wieder aufgehoben werden. Einen alleinigen Effekt von CGRP auf die Freisetzung von TNF- α aus Peritonealmakrophagen und Vollblutzellen konnte - ähnlich zu meinen Experimenten - nicht beobachtet werden [Millet & Vignery, 1997; Feng et al., 1997; Monneret et al., 2000].

In keiner Veröffentlichung fand sich bisher ein Hinweis, der eine zunächst erhöhte Freisetzung von TNF- α durch CGRP in Anwesenheit eines inflammatorischen Stimulus beschreibt. Dies steht nicht im Widerspruch zu meinen Ergebnissen, da durch Ermittlung nur eines Zeitpunktes in den meisten Arbeiten dieser Effekt von CGRP möglicherweise nicht erfasst wurde. Wichtig wäre eine Dosis-Zeitkurve zu ermitteln, um die Wirkungsweise von CGRP besser verstehen zu können. Eine wichtige Rolle könnten auch die löslichen TNF-Rezeptoren dabei spielen. Zielgerichtet wäre daher die Messung dieser freien Rezeptoren sowie die Expression der mRNA ,ergänzt durch die Messung von biologisch und immunologisch aktiven TNF- α .

Einen verstärkenden Effekt von CGRP auf die IL-6-mRNA-Expression [Sakuta et al., 1995] sowie die IL-6-Freisetzung bei LPS-Stimulation konnte auch bei humanen Glioblastom A172 Zellen [Kiryama et al., 1997], Peritonealmakrophagen der Maus [Tang et al., 1998], der Swiss 3T3 Fibroblast-Zell-Linie [Sakuta et al., 1995], kultivierten fetalen Osteoblasten und bei glatten intestinalen Muskelzellen der Ratte [van Assche et al., 1999] beobachtet werden. Übereinstimmend konnte von Torii et al. [1997] bei Peritonealmakrophagen und der Langerhans Zell-Linie XS52 gezeigt werden, dass die LPS-induzierte IL-10-mRNA-Expression nach 6 h und die IL-10-Freisetzung nach 24 h durch 100 nM CGRP verstärkt

wird. Widersprüchlich zu meinen Ergebnissen dagegen ist, dass an den gleichen Zellen unter gleichen Bedingungen ein inhibitorischer Effekt von CGRP auf IL-1 β -mRNA-Expression und IL-1 β -Freisetzung beobachtet wurde.

Bei LPS-stimulierten humanen Vollblutzellen scheint nur der inhibitorische Effekt von CGRP auf die TNF- α -Freisetzung nach 24 h relevant zu sein, da CGRP in dem gleichen System keinen Einfluss auf die IL-1 β -, IL-6- und IL-8-Protein-Bildung hatte [Monneret et al., 2000]. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass zu diesem Zeitpunkt oft schon die Wirkung von CGRP in einem *in-vitro* System aufgehoben war, wenn CGRP den Zellen nur einmal zugegeben wurde.

Eine direkte Induktion der untersuchten Zytokine durch CGRP fand sich vorwiegend bei Zell-Linien und Linien immunkompetenter Zellen sowie bei neuroendokrinen Zellen. So z.B. beobachteten Veronesi et al. [1999] an der (BEAS-2B) SV-40/Adenovirus transformierten humanen Bronchialepithelzelllinie eine Induktion der TNF- α -, IL-6- und IL-8-mRNA-Expression bei Stimulation mit 10 und 100 nM CGRP nach 2 h und die Freisetzung nach 6 h sowie Levite [1998] die Sekretion von TNF- α und IL-10 in einer T-Helferzelle-Typ 2 -(Th 2)-Zellkultur. Zell-Linien sind problematisch, da sie im Vergleich zu Primärzellkulturen ihre Eigenschaften nach mehreren Passagen verändern können.

In der Literatur fand sich bezüglich einer direkten Induktion durch CGRP eine Ausnahme. So beschrieb Tran et al. [2000], dass CGRP in verhältnismäßig geringer Dosis von 0,1 nM eine direkte Induktion der IL-8-Synthese in humanen Epithelzellen der Kornea mit einem Maximum nach 1 h bewirkte. Dabei wurde eine direkte Verbindung zwischen dem CGRP-Rezeptor zur Bindungsstelle des Transkriptionsfaktor AP-1 an der Promotorregion für die IL-8-Genexpression diskutiert. Allerdings konnten sie keine Veränderung der MCP-1 und RANTES-Synthese finden. Wir fanden hingegen, dass in zerebralen Endothelzellen CGRP weder die Transkription noch die Freisetzung von MIP-2 stimuliert, hingegen aber der Effekt von PCW in Bezug auf MIP-2-Transkription und -Freisetzung verstärkt wird. Diese könnte in der Schadenskaskade der bakteriellen Meningitis eine Bedeutung haben, da erhöhte IL-8-Spiegel im Liquor von Patienten gemessen wurden [Spanaus et al., 1997].

4.2. Einfluss von SP und SR140333 auf die mRNA-Expression und Proteinfreisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2

Zum ersten Mal wurde mit dieser Arbeit der Einfluss von SP₁₋₁₁ und SP₁₋₄ auf die Zytokin-Expression bei Stimulation mit PCW von zerebralen Endothelzellen untersucht.

Der Einfluss von SP auf die mRNA-Expression war geringfügig. So führte SP nur zu einer Erhöhung der IL-1 β -, IL-6- und MIP-2-mRNA-Expression um ca. 25 % gegenüber der mit PCW-stimulierten Gruppe.

Die zusätzliche Gabe von 1 μ M des NK-1-Antagonisten SR140333 zu 10 nM SP führte zu einer Inhibition der IL-10-mRNA-Expression. Dagegen wirkte sich die Zugabe von 10 μ M SR140333 zu PCW differenzierter aus. Sie führte zu einer Erhöhung der TNF- α -mRNA-Expression um ca. 80 % sowie zur einer Inhibition der IL-6- und IL-10-mRNA-Expression um ca. 50-60 %.

Auf der Ebene der Proteinfreisetzung führte die Zugabe von 10 und 100 nM SP nach 8 h nur zu einem erhöhten Gehalt an MIP-2 im Zellkulturüberstand. Die Konzentration an bioaktiven TNF- α in Anwesenheit von 10 nM SP im Überstand dagegen war sogar nach 4 h um ca. 40 % gegenüber der mit PCW-stimulierten Gruppe reduziert.

Während bei Zugabe von 10 μ M SR140333 die mRNA-Expression von TNF- α um 80 % erhöht war, war deren Freisetzung um 80 % nach 4 h und noch um 70 % nach 8 h gehemmt. Auf die Freisetzung von IL-6 und IL-10 wirkten sich 10 μ M SR140333 ähnlich hemmend wie auf die mRNA-Expression aus. Dagegen wirkte sich die zusätzliche Gabe von 1 μ M SR140333 zur Stimulation mit 10 nM SP nur auf die TNF- α -Freisetzung nach 8 h Inkubation hemmend aus. Der TNF- α -Wert war dabei um 40 % gegenüber der Gruppe mit PCW-Stimulation und 10 nM SP reduziert.

Alleinige Stimulation der Zellen mit 10 und 100 nM SP führten nur zu einer geringfügigen Induktion der IL-6-Synthese. Die IL-6-Synthese war um ca. 5 % höher gegenüber den Zellen, die nicht stimuliert worden sind. Die Synthese der anderen Zytokine blieb durch die alleinige Gabe von SP unbeeinflusst.

Der Einfluss von SP auf die LPS-, TNF- α - oder IL-1 β -induzierte Zytokin-Expression ist zahlreich in verschiedenen Zellsystemen untersucht worden. Allen bisher veröffentlichten Beobachtungen ist gemein, dass SP, wenn es Wirkung zeigte, immer verstärkend auf die

Stimulanzen-induzierte Zytokin-Synthese wirkte. In der Literatur fanden sich bisher keine Hinweise dafür, dass SP beispielsweise auch vorübergehende inhibitorische Eigenschaften besitzt, so wie ich sie in meinen Experimenten bei der PCW-induzierten TNF- α -Freisetzung nach 4 h festgestellt habe.

SP hat einen verstärkenden Effekt auf die LPS induzierte TNF- α -Sekretion von humanen Monozyten und Makrophagen nach 24 h [Ho et al., 1996; Lee et al., 1994] sowie von Astrozyten in Abhängigkeit von IL-1 nach 6 h [Luber-Narod et al., 1994].

Die Beobachtungen von Marriott & Bost [1998] stimmen mit meinen Ergebnissen insofern überein, dass auch sie keinen Effekt von SP bei der Freisetzung von TNF- α und IL-6 aus kultivierten murinen Makrophagen nach 24 h bzw. 48 h finden konnten.

Ein additiver Effekt von SP auf die IL-6-mRNA-Expression konnte ebenfalls von Lieb et al. [1996] und Palma et al. [1995, 1997] in humanen Monozyten nach 4 h, bei embryonalen Astrozyten sowie in der humanen Astrozytomzelllinie U373MG beschrieben werden. Dagegen fanden Derocq et al. [1996] in humanen Monozyten nach 18 h bzw. 24 h durch SP keine verstärkte IL-6-Sekretion.

Ebenfalls zeigte SP keinen Einfluss bei der LPS-induzierten IL-1-Freisetzung aus murinen Makrophagen [Cook et al., 1991].

Eine erhöhte IL-10-Freisetzung, mit einem Maximum nach 24 h, zeigte sich bei Makrophagen und Monozyten, die mit 0,1 nM SP stimuliert worden sind [Ho et al., 1996].

In polymorphkernigen Leukozyten wirkte sich SP bereits nach einer 1 h Inkubation verstärkend auf die TNF- α -induzierte IL-8-Freisetzung aus [Serra et al., 1994].

Die Wirkungsweise von SP scheint in den untersuchten Zellsystemen nicht gleich zu sein, wobei hinsichtlich der Beobachtungszeiträume und der unterschiedlich applizierten SP-Mengen ein Vergleich zwischen den Beobachtungen erschwert wird.

Der NK-1-Antagonist SR140333 ist bezüglich seiner inhibitorischen Fähigkeiten mehrfach geprüft worden.

So haben Dickerson et al. [1998] die Kinetik der Gen-Transkription von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in der Leber und Milz von Mäusen, die zuvor mit LPS und SR140333 behandelt worden, sind untersucht. Dabei wies SR140333 einen maximalen Hemmungseffekt auf die TNF- α -Transkription in beiden Geweben bereits nach 30 min auf. Nach 2 h jedoch war zwischen der

behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe die Genexpression wieder ungefähr gleich. Auch die TNF- α -Konzentration im Serum war entsprechend der Genexpression nach 30 min maximal reduziert. Weitere Beobachtungen der Arbeitsgruppe zeigten einen „Rebound“ der TNF- α -Expression nach 2 h, dieser schlug sich in einen erhöhten TNF- α -Gehalt im Serum nieder. Der TNF- α -Gehalt im Serum, der zwar nach 2 h deutlich höher war als nach 30 min, war dennoch gegenüber der LPS-stimulierten Kontrolle geringer. Keine Wirkung dagegen zeigte SR140333 auf die Kinetik der IL-6 und IL-1 β -Gen-Transkription bzw. -Sekretion im gleichen Zeitintervall. Obwohl meine Ergebnisse hinsichtlich des Effektes von SR140333 auf die TNF- α -mRNA-Expression widersprüchlich wirken, denke ich, dass ich mit meinem gewählten Zeitpunkt nach 4 h zur Bestimmung der Genexpression deutlich in der von Dickerson et al. beschriebenen „Rebound-Phase“ lag. Begründet sehe ich meine Annahme durch eine deutlich geringere Konzentration an bioaktiven TNF- α im Zellkulturüberstand nach 4 h und 8 h bei Gabe von 10 μ M SR140333 im Vergleich zur TNF- α -Konzentration der PCW-stimulierten Gruppe, wobei die TNF- α -Konzentration nach 8 h wieder geringfügig höher war.

Übereinstimmend mit Dickerson et al. fand auch ich keine Wirkung des NK-1-Antagonisten auf die IL-1 β -Synthese. Eine mögliche Erklärung dafür geben Song et al.[2000], da sie zeigen konnten, dass die SP-induzierte IL-1-Synthese von PAM 212 Keratinozyten NK-2-vermittelt ist. Die spezifische Hemmung des NK-2-Rezeptors führte in diesem Fall zur Inhibition von SP-induzierter IL-1-Produktion.

Bei der Astrozytom-Zell-Linie U373MG konnte durch SR140333 eine Inhibition des additiven Effektes von SP bei IL-1 β -induzierter IL-6-Synthese beobachtet werden. Dagegen war eine alleinige Hemmung der IL-1 β -induzierten IL-6 Synthese durch den NK-1-Blocker nicht möglich [Derocq et al., 1996]. Da stellt sich die Frage, warum in meinen Untersuchungen eine direkte Inhibition der PCW-induzierten IL-6-Synthese durch den NK-1-Blocker möglich war. Eine mögliche Erklärung bieten die Beobachtungen von Cioni et al. [1998]. Sie haben zeigen können, dass Stimulation zerebraler Endothelzellen der Ratte mit je 100 IU/ml TNF- α oder IL-1 β zu einer verstärkten Expression und Sekretion von SP führte. Weiterhin konnten sie zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Spantide die TNF- α - und IL-1 β -induzierte SP-Detektion an der Oberfläche von Endothelzellen dosisabhängig auf ein Niveau reduzierte, das unterhalb der unstimulierten Zellen lag. Nicht zur Erklärung passt, dass das Maximum der SP-Sekretion bei 24-48 h lag. Möglich ist, dass PCW ein wesentlich

stärkerer Induktor der SP-Sekretion ist, sodass durch die Zugabe von SR140333 endogen produziertes SP am Rezeptor gehemmt wurde. Oder aber es spielt das Alter oder der Rattenstamm eine Rolle: während wir die zerebralen Endothelzellen von 3 Wochen alten Tieren gewannen, benutzte die Arbeitsgruppe Cioni et al. für ihre Experimente die Zellen von 3-5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten.

In meinen Experimenten fand sich durch alleinige Gabe von SP auf die zerebralen Endothelzellen nur eine geringfügige Induktion der IL-6-Synthese, während die Bildung der anderen untersuchten Zytokine davon unbeeinflusst blieb. In einer viel zitierten, in der Zeitschrift „Science“ veröffentlichten Arbeit, wurde von Lotz et al. [1988] erstmals beschrieben, dass SP allein in der Lage ist, die Synthese von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in Monozyten anzuregen. Allerdings konnten die Ergebnisse für die IL-1 β - und IL-6-Bildung in Monozyten durch wiederholte Experimente von Lieb et al. [1996] nicht bestätigt werden. Als Erklärung für die Unterschiede der Ergebnisse wurde eine Kontamination mit Endotoxin in den von Lotz et al. durchgeführten Experimenten vermutet. Wiederum ist eine direkte Induktion durch SP von IL-1 in Astrozyten [Martin et al., 1992] sowie von IL-6 in der Zell-Linie U373MG [Gitter et al., 1994; Palma et al., 1995; Derocq et al. und Lieb et al., 1996] bisher nicht widerlegt worden.

Entgegen meinen Ergebnissen konnte Viac et al. [1996] einen direkten Einfluss von SP auf die IL-8-Synthese bei einer humanen Keratinozytenkultur mit einem Maximum nach 12 h finden. Allerdings erreichte die IL-8-Sekretion bereits nach 24-48 h wieder den Basalwert. Möglicherweise habe ich in meinen Experimenten eine vorübergehende Wirkung zeitlich nicht erfasst.

Die Inhibition der IL-8-Synthese durch SR140333 wurde bisher nur an der U373MG Zell-Linie mehrfach beobachtet [Derocq et al., 1996; Lieb et al., 1997; Palma & Manzini, 1998].

LPS induziert in den Zellen des proximalen Tubulus der Ratte über den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor kappa B (NF κ B) die Expression von IL-10 [Rangan et al., 1999]. Auch SP ist über Bindung am NK-1-Rezeptor in der humanen Astrozytom-Zell-Linie U373MG fähig eine Aktivierung von NF κ B auszulösen, was u.a. zur Aktivierung der IL-8-Expression führt [Lieb et al., 1997]. Sollte dieser Weg der Signaltransduktion auch für die Expression von IL-10 in zerebralen Endothelzellen gelten, wäre die Inhibition der IL-10-Synthese durch die Gabe von SR140333 in meinen Experimenten erklärbar.

Übereinstimmend mit meinen Resultaten wurde eine direkte Induktion der IL-10-Synthese in der Literatur bisher nicht beschrieben.

SP₁₋₄

Der Einfluss des N-terminalen SP₁₋₄-Fragmentes auf die IL-6-Freisetzung aus der humanen Bronchial-Epithel-Zell-Linie (BEAS-2) ist von Veronesi et al. [1999] untersucht worden. Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen konnten sie keine Wirkung von SP₁₋₄ auf die IL-6-Freisetzung finden, während sie diese Wirkung wohl aber bei Stimulation mit SP₁₋₁₁ beobachteten. Die meisten stimulatorischen Effekte von SP auf die Synthese der Zytokine konnten mittels eines NK-Blockers wieder aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass vor allem das C-terminale Ende von SP für die stimulatorischen Signale verantwortlich ist. Meine Ergebnisse zeigen einmal mehr, dass Goetzl et al. [1985]; Pegelow et al. [1989]; Werner et al. [1987]; Oehme et al. [1987] & Oehme [1985]; Nieber & Oehme [1987] in ihren Beobachtungen richtig lagen, indem sie behaupteten, dass das N-terminale Ende von SP für die Ausschüttung von Mediatoren und Transmittern verantwortlich ist. Da zerebrale Endothelzellen primär keine Mediatoren oder Transmitter ausschütten, war hier kein anderes Ergebnis zu erwarten.

4.3. Regulation des „Calcitonin Related-Like Receptor“ (CRLR)

Dass PCW die CRLR mRNA-Expression von zerebralen Endothelzellen im zeitlichen Verlauf reguliert, konnte mit dieser Arbeit zum ersten Mal demonstriert werden. Dabei zeigte sich zunächst eine Hochregulierung der CRLR-mRNA um das 1,8-fache gegenüber der Kontrolle nach 2 h, später dann nach 4 und 6 h fällt die mRNA-Expression bis auf ein Viertel der mRNA-Expression im Vergleich zur Expression der Kontrolle. Die Ursache der Reduktion zu späteren Zeitpunkten können wir mit den vorliegenden Ergebnissen nicht erklären. Eine frühe Hochregulation des Rezeptors würde aber gut den frühen proinflammatorischen Effekt von CGRP bei gleichzeitiger Stimulation mit PCW erklären.

Ähnliche Beobachtungen konnten Ono et al. [2000] an einem Maus-LPS-Sepsis-Modell machen, als sie 30 min nach Gabe von LPS die CRLR-mRNA-Expression auf das 2,5-fache gegenüber der Kontrolle hochreguliert sahen, diese danach aber allmählich auf 50 % abfiel, mit dem niedrigsten Level nach 4 h, der dann bis zu 12 h anhielt.

Meine Ergebnisse werden durch Moreno et al. [1999] in anderen Systemen bestätigt, die gezeigt haben, dass in allen humanen zerebralen Gefäßen - so auch in den Endothelzellen und Kapillargefäßen - der CRLR-Rezeptor exprimiert wird.

Der CRLR-Rezeptor zusammen mit RAMP-1-Protein dient CGRP als funktioneller, cAMP-gekoppelter Rezeptor in Aortenendothelzellen [Muff et al., 1998], während der RAMP-2/CRLR-Komplex den funktionellen AM-Rezeptor in humanen Endothel- und glatten Muskelzellen bildet [Kamitani et al., 1999]. Dass RDC-1 und L1-Rezeptoren dagegen keine wesentlichen Bindungsstellen für CGRP und AM darstellen [Chakravarty et al., 2000], ist möglich, da beide Rezeptoren zwar in den zerebralen Endothelzellen exprimiert waren, jedoch deren Transkription durch PCW nicht beeinflusst worden ist.

4.4. Adrenomedullin (AM)-mRNA-Expression und Freisetzung

In allen zerebralen Endothelzellproben konnte AM-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Die Stimulation mit PCW führte zu einer Erhöhung der AM-Transkription nach 2, 4, 6 h mit einem Maximum um das 1,8-fache gegenüber der Kontrolle nach 2 h.

Bei zusätzlicher Stimulation mit 10nM CGRP zu PCW kam es zu einer weiteren Erhöhung der AM-mRNA-Expression mit einem Maximum nach 4 h auf das 1,8-fache gegenüber der PCW-Gruppe. Nach 6 h fiel die AM-Transkription wieder ab.

Der Rezeptor-Antagonist hCGRP₈₋₃₇ ist in Kombination mit PCW oder zusätzlicher Stimulation mit CGRP in der Lage, die AM-Transkription gegenüber PCW bzw. PCW mit 10 nM CGRP-Stimulation signifikant zu hemmen.

CGRP allein bewirkte eine gering gesteigerte AM-mRNA-Expression auf das 1,2-fache gegenüber der Kontrolle.

Da die Überstände von den Proben, in denen auch die AM mRNA-Expression bestimmt wurde, bereits durch ELISA- und RIA-Bestimmungen aufgebraucht waren, konnte somit kein AM(1-50) gemessen werden. Demzufolge ist ein direkter Vergleich mit der AM-mRNA-Expression nicht möglich.

Mit Hilfe eines EIA konnte in Überständen bei den Kontrollen kein AM(1-50) nach 0, 4, 8 und 12 h gemessen werden. Bis zu 8 h nach Stimulation mit CGRP, PCW sowie PCW und CGRP konnte kein AM(1-50) gemessen werden. Erst nach 12 h war AM (1-50) in den zuvor genannten Proben messbar. Dabei waren die AM(1-50)-Konzentrationen um das 3-fache bei

Stimulation mit PCW und CGRP im Vergleich zu den PCW-stimulierten Proben erhöht. Die AM(1-50)-Konzentration der PCW-Proben war wiederum um das ca. 2-fache gegenüber der nur mit CGRP stimulierten Proben erhöht.

Gut korrelieren die Ergebnisse mit denen von Serrano et al. [2000], die in zerebralen Blutgefäßen nur eine schwache AM-Immunreaktivität fanden und dabei vermutet haben, dass die AM-Immunreaktivität von perivaskulären Gliazellen stammt. Anders dagegen konnten Isumi et al. [1998a] AM in Aortenendothelzellen messen. Eine Erklärung, warum ich in meinen Kontrollen kein AM gemessen habe, könnte in der Methode liegen. Isumi et al. haben die Endothelzellen lysiert und gereinigt und mit einem RIA mit hoher Empfindlichkeit (unterer fmol Bereich) gemessen, während ich AM(1-50) nur in den Überständen mit einem EIA gemessen habe, dessen linearer Messbereich zwischen 0,1-10 ng/ml lag. Umso erstaunlicher ist, dass die AM(1-50)-Konzentrationen im Überstand der PCW- bzw. PCW und CGRP-stimulierten zerebralen Endothelzellen im Verhältnis deutlich höher lagen, als bei den von Isumi et al. mit LPS-stimulierten Aortenendothelzellen. Stimulation mit LPS bewirkte nur eine geringfügige Steigerung der AM-Konzentration von aortalen Endothelzellen um das 1,5-fache gegenüber der Kontrolle nach 12 h Inkubation. In der Arbeit von Isumi et al. wurde eine kombinierte Applikation von LPS und CGRP nicht untersucht.

Während in meinem Experimenten AM(1-50) im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit 10 nM CGRP messbar war, zeigte sich bei Isumi et al. bei Stimulation mit 1 μ M CGRP eine Reduzierung der AM-Konzentration auf 85 % im Vergleich zu den unstimulierten Endothelzellen der Aorta. Vermutlich führte der hohe Konzentrationsunterschied von CGRP zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen.

4.4.1. AM (1-50) - TNF- α

Ein möglicher Zusammenhang besteht zwischen der TNF- α -Sekretion und AM-Konzentration im Überstand von zerebralen Endothelzellen. Im dem von mir durchgeführten Experiment zeigte sich, dass bei Stimulation mit PCW und CGRP die AM-Konzentration um das 3-fache im Vergleich zu den PCW-stimulierten Proben erhöht war und dies wiederum mit einer Reduzierung des TNF- α -Gehaltes um ca. 20 % einher ging.

Die Ergebnisse stimmen gut mit denen von Kubo et al. [1998] überein, die an der Makrophagenzelllinie RAW 267.7 eine Suppression der TNF- α - und IL-6-Sekretion durch AM nach LPS-Stimulation beobachteten. Auch Beobachtungen von Isumi et al. [1999] an der

Fibroblasten-Zell-Linie Swiss 3T3 weisen darauf hin, dass AM die Sekretion von TNF- α gegenüber der LPS-Kontrolle um ca. 20 % hemmt.

4.5. SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ Konzentrationen in Zellkulturüberständen

Cioni et al. haben beschrieben, dass in Primärkulturen von zerebralen Endothelzellen nach Stimulation mit TNF- α und IL-1 β es zu einer vermehrten Synthese von SP₁₋₁₁ kommt. In meinen Untersuchungen dagegen konnte ich nach Stimulation mit PCW keine Bildung von SP erkennen; weder unter Kontrollbedingungen noch nach Stimulation mit PCW war es mir mit Hilfe des RIA möglich, SP₁₋₁₁ in den Überständen zu detektieren. Es konnte nur dann SP in den Überständen gemessen werden, wenn die Proben mit SP₁₋₁₁ stimuliert worden waren. Die Stimulation mit PCW und zusätzlicher Gabe von SP führte zu durchschnittlich 70 % höheren Konzentrationen an SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ in den Überständen - im Verhältnis zu den Proben, die nur mit gleicher Konzentration an SP stimuliert worden sind.

Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass sich die Dichte der NK-1-Rezeptoren unter dem Einfluss von PCW und SP verändern könnten.

In der Literatur finden sich bisher nur wenige Angaben darüber, wie sich die Dichte der NK-1-Rezeptoren nach SP oder inflammatorischen Stimulus verändert. Bowden et al. [1994] konnten an Endothelzellen, sowohl in einem *in-vivo* als auch in einem *in-vitro* Modell zeigen, dass nach Stimulation mit SP es vorübergehend zu einer Internalisation der oberflächlichen NK-1-Rezeptoren kommt. So fanden sie in Endothelzellen von Venen, 3 min nach Stimulation mit SP, einen maximalen Anstieg, von 107 immunoreaktiven NK-1-Rezeptoren, in den Endosomen je Endothelzellen. Der Basiszustand, ohne Stimulation mit SP, von nur 15 immunoreaktiven NK-1 Rezeptoren in den Endosomen je Endothelzelle, wurde bereits nach 2 h wieder erreicht.

Aller Wahrscheinlichkeit nach bewirkte auch die Stimulation mit PCW eine Niederregulierung der NK-1-Rezeptoren an der Oberfläche der zerebralen Endothelzellen, sodass weniger SP gebunden werden konnte. Einen Hinweis darauf, dass PCW tatsächlich zur Niederregulierung der NK-1-Rezeptoren führen könnte, gibt die Studie von Johnson & Johnson [1991]. Sie haben den Einfluss von TNF- α und IL-1 β auf die Dichte der NK-1-(Subtyp)-Rezeptoren bei der humanen Astrozytom-Zell-Linie UC11 untersucht. Dabei haben sie festgestellt, dass sowohl TNF- α als auch IL-1 β eine Niederregulierung der NK-Rezeptoren bewirkte.

Diese Effekte waren nach dem Auswaschen der Zytokine reversibel. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Seybold & Abrahams [1995] an Primärkulturen von Neuronen gemacht. Nachdem sie die Neuronen mit 10 nM SP stimuliert hatten, reduzierte sich die Bindungsaffinität für SP um 47 % nach 24 h, die sich wiederum in eine 2fach verstärkte Bindungsaffinität nach 48 h umwandelte. Des Weiteren konnten sie feststellen, dass SP₁₋₇ nicht fähig ist, auf die SP-Rezeptorbindung Einfluss zu nehmen.

Die Stimulation mit PCW in meinen Experimenten hatte vermutlich keinen direkten Einfluss auf die Fragmentierung von SP₁₋₁₁, da die Konzentration an SP₁₋₇ immer ca. einem Drittel der gemessenen SP₁₋₁₁-Konzentration im Überstand entsprach, egal ob mit PCW und SP oder nur mit SP stimuliert worden war.

Inwiefern der NK-1-Rezeptorantagonist SR140333 durch Blockade der Rezeptoren auf die Regulation der NK-1-Dichte an der Zelloberfläche Einfluss nimmt, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht klar. Lediglich war festzustellen, dass sich durch Gabe von SR140333 das Verhältnis der Konzentrationen von SP₁₋₁₁ zu SP₁₋₇ veränderte. So war die Konzentration von SP₁₋₁₁ bei Stimulation mit 10 nM SP und 1 µM SR140333 nur um ca. 43 % gegenüber der Konzentration von SP₁₋₇ erhöht, während bei zusätzlicher Gabe von PCW (PCW+ 10 nM SP + 1 µM SR140333) die SP₁₋₁₁-Konzentration gegenüber der SP₁₋₇ Konzentration um ca. 300 % erhöht war.

Es bleibt weiterhin ungeklärt, in welcher Art und Weise SP-Endopeptidase (SPE) und/oder Endopeptidase-24,11 die Spaltung von SP₁₋₁₁ nach der 7. Aminosäure (Phenylalanin) bewirken. Die Frage, die sich hierbei für mich stellt ist, ob nur gebundenes SP gespalten werden kann oder ungebundenes SP.

Die Rolle von SP₁₋₇ bei der Induktion der Zytokine von zerebralen Endothelzellen kann nur vermutet werden. Wahrscheinlich ist die Rolle ähnlich der von SP₁₋₄, da SP₁₋₇, wie SP₁₋₄ ein N-terminales SP-Fragment ist und dieses wiederum keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Zytokine hatte.

5.0. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an primären kultivierten zerebralen Endothelzellen, einem wesentlichen zellulären Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, inflammatorische Effekte von Neuropeptiden und von Zellwänden von *Streptococcus pneumoniae* in-vitro untersucht. Neuropeptide als Mediatoren des Trigeminovaskulären Systems und PCW tragen wesentlich zur frühen Entzündungsantwort bei bakterieller Meningitis bei.

Es konnte gezeigt werden, dass beide untersuchten Neuropeptide, CGRP stärker noch als SP, den Effekt von PCW in Bezug auf die Expression und Freisetzung von Zytokinen aus zerebralen Kapillarendothelzellen verstärken.

CGRP und SP sind allein nicht in der Lage, diese Zytokine zu induzieren. Umgekehrt regulieren PCW die Dichte der CRLR- bzw. NK-Rezeptoren.

Da die Effekte von CGRP und SP Rezeptor-vermittelt sind, könnte der Einfluss von PCW auf die CRLR bzw. NK-1 Rezeptoren die kostimulatorischen Effekte gut erklären. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Neuropeptide sowohl eine proinflammatorische aber auch eine antiinflammatorische Rolle in der Entzündungskaskade haben. So zeigte CGRP bei Kostimulation mit PCW einen dosis- und zeitabhängigen Einfluss auf die Expression der Zytokine, mit verstärkter Induktion der mRNA-Expression und Proteinfreisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und MIP-2. Im späteren Verlauf dagegen könnte sich die Wirkung von CGRP in einen hemmenden Effekt umkehren. Die nachgewiesene verminderte TNF- α -Konzentration durch CGRP um ca. 40 % gegenüber PCW allein nach 8 h, könnte der Einfluss von CGRP auf die TNF- α -Bildung, der Hochregulation und Freisetzung von löslichen TNF-Rezeptoren oder der antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 sein. Die erhöhten Proteinkonzentrationen von IL-1 β , IL-6 und MIP-2 um ca. 20-40 % zum gleichen Zeitpunkt unterstreichen den proinflammatorischen Effekt, hingegen die erhöhte IL-10-Produktion den immunmodulatorischen Effekt von CGRP zeigt. Durch CGRP₈₋₃₇-Gabe kann der verstärkende Effekt von CGRP auf der Ebene der Transkription gehemmt werden, während sich bei der TNF- α -Proteinfreisetzung nach 8 h in der Tendenz ein „Rebound“ Effekt zeigt.

Wiederum alleinige Gabe von CGRP₈₋₃₇ und PCW hemmt die TNF- α -Proteinbiosynthese um 65%. Allerdings ist die Hemmung der Proteinbiosynthese bei anderen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-10, MIP-2) nicht so stark. Hier bewirkte CGRP₈₋₃₇ nur eine Inhibition zwischen ca.15 % (IL-1 β und MIP-2) und ca. 30 % (IL-6; IL-10). Ähnlich wie CGRP ist SP aber bereits schon

nach 4 h dosisabhängig in der Lage die TNF- α -Konzentrationen zu vermindern. SP wirkt am stärksten bei einer verstärkten MIP-2-Produktion um 20-40 %.

Durch Verabreichung des „Non-Peptide“ NK-1-Rezeptorantagonisten SR140333 wurde nur die TNF- α -, IL-6- und IL-10-Synthese wirkungsvoll gehemmt, während eine verstärkte, durch SP verursachte IL-1 β - und MIP-2-Bildung unbeeinflusst blieb.

Warum die Gabe von SR140333 selektiv die Zytokinproduktion der PCW-stimulierten zerebralen Endothelzellen ohne zusätzliche SP-Stimulation vermindert, bleibt unklar. Dabei wird die Proteinbiosynthese von TNF- α , IL-6 und IL-10 auf 20-50 % gegenüber der nur mit PCW-stimulierten Gruppe reduziert. Da die Proteinbestimmung für maximal zwei Zeitpunkte erfolgte, ist hierbei die Wirkung des NK-1-Rezeptorantagonisten noch weiter zu untersuchen- im Hinblick auf einen „Reboundeffekt“. Weiterhin wäre zu testen, inwiefern durch andere NK-Rezeptorenblocker z.B. für NK-2, die IL-1 β - und MIP-2-Synthese beeinflusst werden kann.

Es ist nur der exogene Einfluss von SP untersucht worden. Interessant wäre es, den Einfluss von PCW auf die PTT-(SP)-mRNA-Expression der zerebralen Kapillarendothelzellen zu untersuchen, da der Nachweis von SP in den Zellkulturüberständen mit Hilfe des RIA nicht gelang, aber in der Literatur eine Synthese von SP von zerebralen Endothelzellen beschrieben worden ist.

Mit Hilfe des RIA konnte festgestellt werden, dass Stimulation mit PCW eine Niederregulation der NK-Rezeptoren an der Oberfläche von Endothelzellen bewirkt - mit der Folge, dass dadurch mehr SP₁₋₁₁ und SP₁₋₇ im Überstand vorkommt. Die Rolle von SP₁₋₇ im Entzündungsmechanismus bleibt noch ungeklärt.

In den Untersuchungen wurde gezeigt, dass PCW zunächst eine schnelle Hochregulierung der CRLR-mRNA-Expression bewirkte, mit anschließender länger andauernder Niederregulierung. CGRP könnte bei PCW-stimulierten zerebralen Endothelzellen in der frühen Phase der Inflammation proinflammatorisch wirken und zu einer verstärkten AM-Expression führen. Dieser CRLR-Rezeptor wiederum vermittelt möglicherweise im späteren Verlauf der Entzündungsreaktion den hemmenden Effekt auf die Entzündungskaskade.

Folgende Mechanismen bleiben noch ungeklärt:

1. CGRP und AM bewirken eine Reduzierung von TNF- α . Die Frage hierbei ist, ob CGRP diesen Effekt auf der Ebene der Transkription bewirkt, oder ob über die Regulation des CRLR-Rezeptors das Signal von AM unterstützt wird, oder aber dieser Effekt durch die Freisetzung von löslichen TNF- α -Rezeptoren oder die antiinflammatorische Wirkung vom vermehrt freigesetzten IL-10 kommt.
2. Unter inflammatorischen Bedingungen ist die Regulation der Proteine RAMP-1 und RAMP-2 zu untersuchen, welche entscheidend für die Regulation der Funktion des CRLR-Rezeptors sind. Weiterhin sind neueste Erkenntnisse, die zeigen, dass noch weitere Proteine wie, z.B. „receptor component protein“(RCP) in Verbindung mit dem CRLR-Rezeptor, stehen und diese entscheidend bei der Vermittlung der Signaltransduktion von CGRP und AM eine Rolle spielen, mit unserem Modell zu überprüfen [Evans et al., 2000].
3. Die exogene AM-Wirkung auf die zerebralen Endothelzellen (dosis- und zeitabhängig) muss geklärt werden.
4. Abschließend lässt sich sagen, dass die Neuropeptide SP, CGRP und AM als Modulatoren der Immunantwort zu betrachten sind. Insbesondere CGRP hat einen vorwiegend proinflammatorischen Charakter. Der Mechanismus der frühen Verstärkung der Entzündungsantwort könnte durch die frühe Hochregulation von CRLR erklärt werden. Diese Beobachtungen könnten dazu beitragen, dass relativ rasch therapeutische Interventionen entwickelt werden, die die enge Interaktion von „neurogener“ und „klassischer“ Inflammation unterbrechen. Damit könnte neben der Nozizeption, die zum Kopfschmerz führt, auch die Freisetzung von Zytokinen und vasoaktiven Substanzen, die zum Leukozyten-Einstrom und zur Hyperämie und damit zu den gefürchteten Komplikationen bei bakterieller Meningitis beitragen, unterbrochen werden.
5. Diese Arbeit spiegelt nur einen kleinen Einblick in das komplexe Netzwerk zwischen Nervensystem und Immunsystem wider. Wichtig wird sein, das Nerven- und Immunsystem in Zukunft als Einheit zu erforschen und zu begreifen.

6.0. Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Hughes, C.C., et al. (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci*, 103, 23-37.
- Adams, D.H. & Schaw, S. (1994). Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet*, 343, 831-836.
- Aiyar, N., Rand, K., et al. (1996). A cDNA Encoding the Calcitonin Gene-Related Peptide Type 1 Receptor. *J Biological Chemistry*, 271(19), 11325-11329.
- Aloisi, F., Bersellino, G., et al. (1995). Cytokine regulation of astrocyte function: in-vitro studies using cells from the human brain. *Int J Dev Neurosci*, 13, 265-274.
- Aloisi, F., Care, A., et al. (1992). Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 149, 2358-2366.
- Amara, S.G., Arriza, J.L., et al. (1985). Expression in brain of messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*, 229, 1094-1099.
- Amara, S.G., Jonas, V., et al. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature*, 298, 240-244.
- Andersson, P.B., Perry, V.H., (1992). Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J Exp Med*, 176, 255-259.
- Angstwurm, K., Freyer, D. (1998). Tumor necrosis factor alpha induces only minor inflammatory changes in the central nervous system, but augments experimental meningitis. *Neuroscience*, 86(2), 627-634.
- Arai, K., Lee, F., et al. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*, 59, 783-836.
- Autelitano, D.J. (1998). Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 250(3), 689-693.
- Baskaya, M.K., Suzuki, Y., et al. (1995). Effects of adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin on cerebral circulation in dogs. *J Cerebral Blood Flow Metab*, 15, 827-834.
- Bebo, B.F., Jr. & Linthicum, D.S. (1995). Expression of mRNA for 55-kDa and 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptors in mouse cerebrovascular endothelium: effects of interleukin-1 beta, interferon-gamma and TNF-alpha on cultured cells. *J Neuroimmunol*, 62, 161-167.
- Benveniste, E.N., Tang, L.P., et al. (1995). Differential regulation of astrocyte TNF-alpha expression by the cytokines TGF-beta, IL-6, and IL-10. *Int J Dev Neurosci*, 13, 341-349.
- Benvensite, E.N., Sparacio, S.M., et al. (1990). Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in astrocytes. *J Neuroimmunol*, 30, 201-212.
- Benveniste, E.N. (1995). Cytokine production. In: Neuroglia, Kettenmann, H. (editor). 700-713.
- Berson, S.A. & Yalow, R.S. (1968). General Principles of Radioimmunoassay. *Clin Chim Acta*, 22 (1), 51-69.
- Black, R.A., Rauch, C.T., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor alpha from cells. *Nature*, 385 (6618), 729-733.
- Bogdan, I., Leib, S.L., et al. (1997). Tumor necrosis factor-alpha contributes to hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis*, 176, 693-697.
- Bohr, V., Hansen, B., et al. (1983a). 875 cases of bacterial meningitis Part I of a three-part series: Clinical data, prognosis, and the role of specialised hospital departments. *J Infect*, 7, 21-30.
- Bohr, V., Hansen, B., et al. (1983b). Sequelae from bacterial meningitis and their relations to the clinical condition during acute illness, based on 667 questionnaire returns. Part II of a three part series. *J Infect*, 7, 102-110.

- Bohr, V., Paulson, O.B., et al. (1984). Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol*, 41(10), 1045-1049.
- Bowden, J. J., Garland, A.M., et al. (1994). Direct observation of substance P-induced internalization of neurokinin 1 (NK1) receptor at sites of inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 8964-8968.
- Bowman, P.D., Betz, L.B., et al. (1981). Primary culture of capillary endothelium from rat brain. *In Vitro*, 17, 352-362.
- Brain, S.D. & Williams, T.J. (1985). Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*, 86, 855-860.
- Brain, S.D., Williams, T.J., et al. (1985). Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature*, 313, 54-56.
- Brain J.E. Jr., Heistad, D., et al. (1995). Mechanism of Endotoxin-induced Dilatation of Cerebral Arterioles. *Am J Physiol*, 269, H783-788.
- Braun, J.S., Novak, R., et al. (1999). Neuroprotection by caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med*, 5(3), 298-302.
- Buchter, E.C. (1991). Leucocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1036.
- Buckley, T.L., Brain, S.D., et al. (1991a). Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J Immunol* 146, 3424-3430.
- Buckley, T.L., Brain, S.D., et al. (1991b). Time-dependent synergistic interactions between the vasodilator neuropeptide, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of inflammation. *Br J Pharmacol*, 103, 1515-1519.
- Butler, J.C., Hoffmann, J., et al. (1996). The continued emergence of drug resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States: an update from the Centers for Disease Control and Prevention's Pneumococcal Sentinel Surveillance System. *J Infect Dis*, 174, 986-993.
- Buzzi, M.G., Carter, W.B., et al. (1991). Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion. *Neuropharmacology*, 30, 1193-1200.
- Chakravarty, P., Suthar, T.P., et al. (2000). CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for Calcitonin Receptor-Like Receptor (CRLR) and Receptor Activity Modifying Proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol* 130, 189-195.
- Chang, M.M., Leeman S.E., et al. (1971). Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Bio*, 1232(29), 86-87.
- Chang, C.P., Pearse, R.V., et al. (1993). Identification of a seven transmembrane helix receptor for corticotropin-releasing factor and sauvagine in mammalian brain. *Neuron*, 11, 1187-1195.
- Chao, C.C., Hu, S., et al. (1992). Cytokine release from microglia: Differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. *J Infect Dis*, 166, 847-853.
- Chen, Z.B., Hedner, J., et al. (1990). Local effects of substance P on respiratory regulation in the rat medulla oblongata. *J Appl Physiol*, 68(2) 693-699.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Cioni C, Renzi, D., et al. (1998). Enhanced secretion of substance P by cytokine-stimulated rat brain endothelium cultures. *J Neuroimmunol*, 84(1), 76-85.
- Cook, G.A., Blum, A.M., et al. (1991). Substance P does not alter interleukin-1 expression by splenic or granuloma macrophages in murine schistosomiasis. *J Neuroimmunol*, 33(3), 217-225.
- da Cunha A., Jefferson, J.A., et al. (1993). Glia cell-specific mechanisms of TGF-beta-1 induction by IL-1 in cerebral cortex. *J Neuroimmunol*, 42, 71-86.

- Davidson, M., Parkinson, A., et al. (1994). The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska 1986, 90-ethnic differences and opportunities for prevention. *J Infect Dis*, 170, 368-376.
- de Martin, R., B., Vanhove, B., et al. (1993). Cytokine-inducible expression in endothelial cells of I kappa B alpha-like gene is regulated by NFkB. *EMBO J*, 12, 2773-2779.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., et al. (1991). Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174, 1209-1220.
- Derocq, J.M., Segui, M., et al. (1996). Effect of substance P on cytokine production by astrocytic cells and blood mononuclear cells: characterization of novel tachykinin receptor antagonists. *FEBS Lett*, 399, 321-325.
- DeRose, V., Robbins, R.A., et al. (1994). Substance P Increases Neutrophil Adhesion to Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol*, 152, 1339-1346.
- Diab, A., Zhu, J., et al. (1997). Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae induce different intracerebral mRNA cytokine patterns during the course of experimental bacterial meningitis. *Clin Exp Immunol*, 109, 233-241.
- Dickerson, C., Udem, B., et al. (1998). Neuropeptide regulation of proinflammatory cytokine responses. *J Leukoc Biol*, 63(5), 602-605.
- Dinarello, C.A. (1994). Interleukin-1 In: The Cytokine Handbook. A.W.Thomson (editor). Academic Press Inc. San Diego, CA 92101
- Durand, M.L., Calderwood, S.B. et al. (1993). Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N Engl J Med*, 328, 21-28.
- Edwards, R.M., Stack, E.J., et al. (1991). Calcitonin Gene-Related Peptide Stimulates Adenylate Cyclase and Relaxes Intracerebral Arterioles. *J Pharmacol Exp Ther*, 257, 1020-1024.
- Evans, B.N., Rosenblatt, M.I., et al. (2000). CGRP-RCP, a novel protein required for signal transduction at calcitonin-gene-related peptide and adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*, 275(40), 31438-31443.
- Feng, Y., Tang, Y., et al. (1997). Inhibition of LPS Induced TNF- α production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Science*, 61(20), PL 281-287.
- Fenoll, A., Buorgan, C., et al. (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance in clinical of Streptococcus pneumoniae isolates causing systemic infection in Spain, 1979-1989. *Rev Infect Dis*, 13, 56-60.
- Flick, D.A. & Gifford, G.E. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assay for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*, 68, 167-175.
- Flühmann, B., Muff, R., et al. (1995). A Human orphan calcitonin receptor-like structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 206, 341-347.
- Flühmann, B., Lauber, M., et al. (1997). Tissue-specific mRNA expression of a calcitonin receptor-like receptor during fetal and postnatal development. *Brain Res*, 774, 184-192.
- Frei, K., Malipiero, U.V., et al. (1989). On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*, 19, 689-694.
- Freyer, D., Weih, M., et al. (1996). Pneumococcal cell wall components induce nitric oxide synthase and TNF- α in astroglial-enriched cultures. *Glia*, 16, 1-6.
- Freyer, D., Manz, R., et al. (1999). Cerebral Endothelial Cells Release TNF- α After Stimulation with Cell Walls of Streptococcus pneumoniae and Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase and ICAM-1 Expression Via Autocrine Loops. *J Immunol* 163(8), 4308-4314.
- Friedland, I.R. & Klugman, K.P. (1992). Penicillin-resistant pneumococcal infections in South African children. *Am J Dis Child*, 146, 920-923.
- Gangula, P.R., Zhao, H., et al. (2000). Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. *Hypertension*, 35 (1), 470-475.

- Gearing, A.J., Beckett, P., et al. (1994). Processing of tumor necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature*, 370, 555
- Gibson, S.J., Polak, J.M., et al. (1984). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the spinal cord of man, and eight other species. *J Neurosci*, 43, 1101-1111.
- Gitter, B.D., Regoli, D., et al. (1994). Interleukin-6 secretion from human astrocytoma cells induced by substance P. *J Neuroimmunol*, 51(1), 101-108.
- Glabinski, A., Krajewski, S., et al. (1998). Tumor necrosis factor-alpha induced pathology in the rat brain: Characterization of stereotaxic injection model. *Folia Neuropathol*, 36, 52
- Goadsby, P.J. & Edvinsson, L (1997). Extrinsic Innervation: Transmitter, Receptors, and Functions- The Trigeminovascular System. In *Primer on Cerebrovascular Diseases*, Academic Press, 67-70.
- Goadsby, P.J., Edvinsson, L., et al. (1990). Vasoactive release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*, 28, 183-187.
- Goadsby, J.P. & Edvinsson, L. (1994). Human in vivo evidence for trigeminal activation in cluster headache. *Brain*, 117, 427-434.
- Goetzl, E.J., Chernov, T., et al. (1985). Neuropeptide regulation of the expression of immediate hypersensitivity. *J Immunol*, 135, 802-805.
- Gold, R. (1999). Epidemiology of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, 13(3), 516-525.
- Hänze, J., Dittrich, K., et al. (1997). Molecular cloning of a novel human receptor gene with homology to the rat adrenomedullin receptor and high expression in heart and immune system. *Biochem Biophys Res Commun*, 240, 183-188.
- Hirano, T., Akira, S., et al. (1990). Review. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immuno Today*, 11(12), 443-449.
- Ho, W.Z., Kaufman, D., et al. (1996). Substance P augments interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha release by human cord blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol* 71(1-2), 73-80.
- Hoffmann, O., Dirnagl, U., et al. (2001). The trigeminovascular system in bacterial meningitis. *Microsc Res Tech*, 53(3) 188-192.
- Holzer, P. (1988). Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of the tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. *Neurosci*, 24, 739-768.
- Holzer, P. (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for thin sensory neurones. *Pharmacol Rev*, 43, 143-201.
- Horuk, R. (1994). Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol Sci*, 15, 159-165.
- Hua, X.Y., Theodorsson-Norheim E., et al. (1985). Multiple tachykinins (neurokinin A, neurokinin K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept*, 13, 1-19.
- Ikedo, U., Kanbe, T., et al. (1996). Adrenomedullin Augments Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Cytokine-Stimulated Cardiac Myocytes. *Circulation*, 94, 2560-2565.
- Isumi, Y., Shoji, H., et al. (1998a). Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 139(3), 838-846.
- Isumi, Y., Minamino, N., et al. (1998b). Adrenomedullin Production in Fibroblasts: Its Possible Function as a Growth Regulator of Swiss 3T3 Cells. *Endocrinology*, 139(5), 2552-2563.
- Isumi, Y., Kubo, A., et al. (1999). Adrenomedullin suppresses interleukin-1beta-induced tumor necrosis factor-alpha production in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 463(1-2) 110-114.
- Johnson, C.L. & Johnson, C G (1991). Tumor necrosis factor and interleukin-1 down-regulate receptors for substance P in human astrocytoma cells. *Brain Res*, 564(1) 79-85.
- Jougasaki, M. & Jr. Burnett, J.C. J. (2000). Review: Adrenomedullin: Potential in Physiology. *Life Sciences*, 66(10), 855-872.

- Kamitani, S., Asakawa, M., et al. (1999). The RAMP2/CRLR complex is a functional adrenomedullin receptor in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *FEBS Letts*, 448(1), 111-114.
- Kapas, S., & Clark, J.L. (1995). Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 217, 832-838.
- Kapas, S., Catt, K.J., et al (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem*, 270 (43), 25344-25347.
- Kaplan, S.L. (1999). Clinical presentation, diagnosis and prognostic factors of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, 13(3) 579-594.
- Kaube, H., Keay, K., et al. (1993). Expression of c-fos-like immunoreactivity in the trigeminal nucleus caudalis and high cervical cord following stimulation of the sagittal sinus in cat. *Brain Res*, 629, 95-102.
- Kennedy, P.G.E., Rodgers, J., et al. (1997). A substance P antagonist, RP-67580, ameliorates a mouse meningoencephalitic response to *Trypanosoma brucei brucei*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 4167-4170.
- Kettenmann, H. (Editor): (1995). Neuroglia Oxford University Press.
- Kiriyama Y., Murayama, T., et al. (1997). Protein kinase A-dependent IL-6 production induced by calcitonin in human glioblastoma A172 cells. *J Neuroimmunol*, 76(1-2), 139-144.
- Kitamura, K., Kangawa, K., et al. (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 553-560.
- Koedel, U., Bernatowicz, A. et al. (1996). Systemically (but not intrathecally administered IL-10 attenuates pathophysiologic alteration in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol*, 157(11), 5185-5191.
- Kopp, E., Medzhitov, J, et al. (1999). ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes and Development*, 13, 2059-2071.
- Kotani, H., Hoshimaru, M., et al. (1986). Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, 7078-7084.
- Kubo, A, Minamino, N., et al. (1998). Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J Biol Chem*, 273(27), 16730-16738.
- Lee C.M., Javitch, J.A., et al. (1983). 3H substance P binding to salivary gland membranes: regulation by guanyl nucleotides and divalent cations. *Mol Pharmacol*, 23, 563-572.
- Lee, H.R., Ho, W.Z., et al. (1994). Substance P augments tumor necrosis factor release in human monocyte-derived macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4, 419-423.
- Lehmann, A.K., Halstensen, A., et al. (1995). High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun*, 63, 2109-2112.
- Leib, S.L. & Täuber, M.G. (1999a). Meningitis (I)- Differentialdiagnose; aseptische und chronische Meningitis. *Ther Umsch*, 56(11), 631-639.
- Leib, S.L. & Täuber, M.G. (1999b). Meningitis (II)-acute bacterial meningitis. *Ther Umsch*, 56(11),640-646.
- Leib, S.L. & Täuber M.G. (1999c). Review: Pathogenesis of bacterial Meningitis. *Infect Dis Clin North Am*, 13(3), 527-548, v-vi.
- Levine, J.D., Fields, H.L., et al. (1993). Peptides and an the primary afferent nociceptor. *J Neurosci*,13(6), 2273-2286.
- Levite, M. (1998). Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. *Proc Nat Acad Sci USA*, 95, 12544-12549.
- Lieb, K., Fiebich, B.L., et al. (1996). Effects of substance P and selected other neuropeptides on the synthesis of interleukin-1 β and interleukin-6 in human monocytes: a re-examination. *J Neuroimmunol*, 67, 77-81.
- Lieb, K., Fiebich, B.L., et al. (1997). The neuropeptide substance P activates transcription factor NF-kappa B and kappa B-dependent gene expression in human astrocytoma cells. *J Immunol*, 159(10), 4952-4958.

- Liu, T., Clark, R.K., et al. (1994). Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25 (7), 1481-1488.
- Loesch A., Dormer, F. et al. (1993). Electron-immunocytochemistry of peptides in endothelial cells of rabbit cerebral vessels following perfusion with a perfluorocarbon emulsion. *Brain Res*, 611, 333-337.
- Lotz, M., Vaughan, J.H., et al. (1988). Effekt of Neuropeptide on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 241, 1218-1222.
- Luber-Narod, J., Boyd, N.D. et al. (1990). Guanine nucleotides decrease the affinity of substance P binding to its receptor. *Eur J Pharmacol*, 188, 185-191.
- Luber-Narod, J., Karge, R., et al. (1994). Substance P Enhances the Secretion of Tumor Necrosis Factor- α from Neuroglia Cells Stimulated with Lipopolysaccharide. *J Immunol*, 152, 819-824.
- Lundberg, J.M. & Saria, A. (1987). Polypeptide-containing neurones in airway smooth muscle. *Ann Rev Physiol*, 49, 557-572.
- Maggi, C.A. & Meli, A. (1987). The sensory efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurones. *Gen Pharmacol*, 19, 1-43.
- Maggi, C.A., Patachini, R., et al. (1993). Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol*, 13, 23-93.
- Mantyh, P.W., Gates, T., et al. (1989). Autoradiographic localisation and characterisation of tachykinin receptor in the rat brain and peripheral tissues. *J Neurosci*, 9, 258-279.
- Mantyh, P.W. (1991). Substance P and the inflammatory immune response. *Ann N Y Acad Sci*, 632, 263-271.
- Marriott, I. & Bost, K.L. (1998). Substance P diminishes lipopolysaccharide and interferon- γ -induced TGF- β 1 production by cultured murine macrophages. *Cell Immunol*, 183(2), 113-120.
- Martin, F.C., Charles, A.C, et al. (1992). Substance P stimulates IL-1 production by astrocytes via intracellular calcium. *Brain Res*, 599(1), 3-18.
- Marton, A., Gylas, M., et al. (1991). Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Infect Dis*, 163, 542-548.
- McCulloch, J., Uddmann, R., et al (1986). Calcitonin gene related peptide: Functional role in cerebrovascular regulation. *Proc Nat Acad Sci*, 83, 1-5.
- McEver, R.P., Moore, K.L., et al. (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* 270, 11025-11028.
- McLatchie, L.M., Fraser N.J., et al. (1998). RAMPs regulate the transport and the ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 398, 333-339.
- Meir, E.G. v. (1995). Cytokines and Tumours of the Central Nervous System. *Glia*, 15, 264-288.
- Metwali, A., Blum, A.M., et al. (1994). Eosinophils within the healthy or inflamed human intestine produce substance P and vasoactive intestinal peptide. *J Neuroimmunol*, 52, 69-78.
- Miksits, K., Großgebauer, K. & Hahn, H. (1992). Bakterien, Allgemeine Bakteriologie, in Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Allgemeine u. Spezielle Bakteriologie. Miksits Klaus (Editor), Springer Verlag Berlin 1992, 99-102.
- Millet I., Phillips, R.J., et al. (2000). Inhibition of NF κ B Activity and Enhancement of Apoptosis by the Neuropeptide Calcitonin Gene-related Peptide. *J Bio Chem*, 275(20), 15114-15121.
- Millet, I. & Vignery, A. (1997). The Neuropeptide calcitonin gene-related peptide inhibits TNF- α but poorly induces IL-6 production by fetal rat osteoblasts. *Cytokine*, 9(12), 999-1007.
- Minota, S., Dum, N.J., et al. (1981). Substance P-induced depolarization in sympathetic neurons: not simple K-channel inactivation. *Brain Res*, 216, 224-228.
- Mizuno, T., Sawada, T., et al. (1994). Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 205 1907-1915.

- Molina, J.M., Copper, G.J.S., et al. (1990). Induction of insulin resistance in vivo by amylin and calcitonin gene-related peptide. *Diabetes*, 39, 260-265.
- Monneret, G., Pachot, A., et al. (2000). Procalcitonin and Calcitonin Gene-related Peptide decrease LPS-induced TNF Produktion by human circulating blood cells. *Cytokine*, 12 (6) 762-764.
- Moreno, M.J., Cohen, Z., et al. (1999). Functional Calcitonin Gene-Related Peptide Type 1 and Adrenomedullin Receptors in Human Trigeminal Ganglia, Brain Vessels, and Cerebromicrovascular or Astroglial Cells in Culture. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 1270-1278.
- Mori, Y., Takaysu, M., et al. (1997). Effects of adrenomedullin on rat arterioles. *Eur J Pharmacol*, 330, 195-198.
- Moss, M.L., Jin, S.L., et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor necrosis factor- α . *Nature*, 385 (6618), 733-736.
- Muff, R., Leuthauser K., et al. (1998). Receptor activity modifying proteins regulate the activity of a calcitonin gene-related peptide receptor in rabbit aortic endothelial cells. *FEBS Lett*, 441(3), 366-368.
- Murphy, E., Hieny, S., et al. (1993). Detection of in vivo expression of interleukin-10 using semi-quantitative polymerase chain reaction method in *Schistosoma mansoni* infected mice. *J Immunol Methods*, 162, 211-223.
- Mustafa, M.M., Ramilo, O., et al. (1990). Cerebrospinal fluid prostaglandins, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor in bacterial meningitis. Clinical and laboratory correlations in placebo-treated and dexamethasone-treated patients. *Am J of Diseases of Children*, 144, 883-887.
- Mustafa, M.M., Ramilo, O., et al. (1989). Tumor necrosis factor in mediating experimental *Haemophilus influenzae* type B meningitis. *J Clin Invest*, 84, 1253-1259.
- Nabata, T., Morimoto, S., et al. (1990). Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured bascular smooth muscle cells. *Biochem Int*, 20, 445-453.
- Nagashima, A., Iakano, Y., et al. (1989). Cardiovascular role of tachykinin peptides in the nucleus tractus solitarii of rats. *Brain Res*, 487, 392-396.
- Nagata, D., Hirata, Y., et al (1999). Hypoxia-induced adrenomedullin production in the kidney. *Kidney Int* 55 (4) 1259-1267.
- Nawa, H., Hirose, T., et al. (1983). Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain SP precursor. *Nature*, 306, 32-36.
- Nawa, H., Kotani, H., et al. (1984). Tissue- specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*, 312, 729-734.
- Nelson, R.M., Cecconi, O., et al. (1993). Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*, 82, 3253-3258.
- Newbold, P. & Brain, S.D. (1993). The modulation of inflammatory oedema by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol*, 108, 705-710.
- Nieber, K. & Oehme, P. (1987). Effect of substance P (SP) and the N-terminal SP-analogue SP (1-4) on the pre- and postsynaptic transmitter release in rat adrenal gland slices. *Biomed Biochim Acta*, 46(1), 103-109.
- Nuki, C. Kawasaki, H., et al. (1993). Vasodilator effect of adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide receptors in rat mesenteric vascular beds. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 245-251.
- Nyberg, F., Le Grevés, P., et al. (1988). Modulation of Endopeptidase activity by calcitonin gene related peptide: a mechanism affecting substance P action? *Biochimie*, 70, 65-68.
- Oehme, P., Hecht, K., et al. (1987). Prevention of stress-induced involution of the thymus in rats by substance P (SP1-11) and its N-terminal fragment. SP1-4. *Pharmazie*, 42, 34-36.
- Oehme, P. (1985). Relation of substance P to catecholamine metabolism and stress. *Biomed Biochim Acta*, 44(10), 1401-1409.
- Ono, Y., Okano, I., et al. (2000). Decreased Gene Expression of Adrenomedullin Receptor in Mouse Lungs during Sepsis. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 197-202.

- Owji, A.A., Smith, D.M., et al. (1995). An abundant and specific binding site for the novel vasodilator adrenomedullin in the rat. *Endocrinology*, 136, 2127-2134.
- Paegelow, I., Werner, H., et al. (1989). Influence of substance P and substance P-sequences on immunocompetent cells. *Pharmazie*, 44, 145-146.
- Palma, C. & Manzini, S. (1998). Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells. *J Neuroimmunol*, 81(1-2), 127-137.
- Palma, C., Minghetti, et al. (1997). Functional characterization of substance P receptors on cultured human spinal cord astrocytes: synergism of substance P with cytokines in inducing interleukin-6 and prostaglandin E2. *Glia*, 21(2), 183-193.
- Palma, C., Urbani, F., et al. (1995). Interleukin-6 production by U373 MG, a human astrocytoma cell line: different pathway involved in substance P and lipopolysaccharide activation. *J Neuroimmunol*, 59, 155-163.
- Parameswaran, N., Disa J., et al. (2000). Activation of multiple mitogen-activated protein kinases by recombinant calcitonin gene-related peptide receptor. *Eur J Pharmacol*, 389, 125-130.
- Paris, M.M., Hickey, S.M., et al. (1997). The effect of interleukin-10 on meningeal inflammation in experimental bacterial meningitis. *J Infect Dis*, 176, 1239-1246.
- Persson, S., Post, C., et al., (1992). Decreased neuropeptide-converting enzyme activities in CSF following collagen-induced arthritis in male rats. *Brain Res*, 581, 273-282.
- Pfister, H.W., Koedel, U., et al. (1990). Microvascular changes during the early phase of experimental bacterial meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10, 914-922.
- Pfister H.W., Feiden, W., et al. (1993). Spectrum of complications during bacterial meningitis in adults. Results of a prospective clinical study. *Arch Neurol*, 50(6), 575-581.
- Pfister, H.W., Koedel, U., et al. (1992). Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. *Stroke*, 23(12), 1798-1804.
- Pfister, H.W., Kumpfel, T., et al. (1995). Involvement of substance P in pial arteriolar vasodilatation during pneumococcal meningitis in the rat. *Neuroreport*, 6(9), 1301-1305.
- Pomeroy, S.L., Holmes, S.L., et al. (1990). Seizures and other neurologic sequelae of bacterial meningitis in children. *N Engl J Med* 323(24), 1651-1657.
- Quagliarello, V. & Scheld, W.M. (1992). Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med*, 327, 864-872
- Quagliarello, V.J., Wispelwey, B., et al. (1991). Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat: Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest*, 87, 1360-1366.
- Ramilo, O., Saez Llorens, X., et al. (1990). Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J Exp Med*, 172, 497-507.
- Rangan, G.K., Wang, Y., et al. (1999). Inhibition of NF-kappa B activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 2), F779-789.
- Rieckmann, P., Albrecht, M., et al. (1995). Semi-quantitative analysis of cytokine gene expression in blood and cerebrospinal fluid cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Res Exp Med Berl*, 195, 17-29.
- Ring, A., Weiser, J.N., et al. (1998). Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*, 102, 347-360.
- Rosenberg, G.A., Estrada, E.Y., et al. (1995). Tumor necrosis factor-alpha induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: An expanded therapeutic window. *Brain Res*, 703, 151
- Rosenfeld, M.G., Amara, S.G., et al. (1981). Altered expression of the calcitonin associated with RNA polymorphism. *Nature*, 290, 63-65.

- Rosenfeld, M.G. Mermod, J.J., et al. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue specific RNA processing. *Nature*, 304, 129-135.
- Rusconi, F., Parizzi, F., et al. (1991). Interleukin-6 activity in infants and children with bacterial meningitis. The collaborative study on meningitis. *Pediatr Inf Dis J*, 10, 117-121.
- Rothswell, N. J., & Hopkins, S. J. (1995). Cytokines and the nervous system II: actions and mechanisms of action. *TINS*, 18(3) 130-136.
- Sakuta, H., Inaba, K., et al. (1995). Calcitonin gene-related peptide enhances cytokine-induced IL-6 production by fibroblasts. *Cell Immunol*, 165(1), 20-25.
- Sams, A., & Jansen-Olesen, I. (1998). Expression of calcitonin receptor and receptor-activity-modifying proteins in human cranial arteries. *Neurosci Lett*, 258 (1), 41-44.
- Samson, W.K., Murrphy, T.C., et al. (1998). Central mechanisms for the hypertensive effects of preproadrenomedullin-derived peptides in conscious rats. *Am J Physiol*, 274(5Pt2), R1505-1509.
- Saukkonen, K., Sande, S., et al. (1990). The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* 171, 439-448.
- Scharrer, B., Smith, E.M., & Stefano G.B. (Editors) *Neuropeptides and Immunoregulation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994:540-571:88-4.
- Schini Kerth, V.B., Fisslthaler, B., et al. (1994). CGRP enhances induction of NO synthase in vascular smooth muscle cells via a cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol*, 267, H2483-2490.
- Schneider, O., Michel, U., et al. (1999). Clinical outcome in pneumococcal meningitis correlates with CSF lipoteichoic acid concentrations. *Neurology*, 53(7), 1584-1587.
- Schuchat, A., Robinson, K., et al. (1997). Bacterial Meningitis in the United States in 1995. *N Engl J Med*, 337, 970-976.
- Schumann, R.R., Pfeil, D., et al. (1998). Lipopolysaccharide and Pneumococcal Cell Wall components Activate the Mitogen Activated Protein Kinase erk-1 and p38 in Astrocytes. *Glia*, 22, 295-305.
- Seebach, J., Bartholdi, D., et al. (1995). Experimental Listeria meningoencephalitis. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and -2 are produced intrathecally and mediate chemotactic activity in cerebrospinal fluid of infected mice. *J Immunol*, 155, 4367-4375.
- Serra, M.C., Calzetti, F., et al. (1994). Effect of substance P on superoxide and IL-8 production by human PMNL. *Immunology*, 82(1), 63-69.
- Serrano, J., Uttenthal, L.O., et al. (2000). Distribution of adrenomedullin-like immunoreactivity in the rat central nervous system by light and electron microscopy. *Brain Res*, 853(2), 245-268.
- Shimekake, Y., Nagata, K., et al. (1995). Adrenomedullin stimulates two signal transduction pathways, cAMP accumulation and Ca²⁺ mobilization, in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 270, 4412-4417.
- Siegling, A., Lehmann, M., et al. (1994). A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J Immunol Methods*, 177, 23-28.
- Sigrist, S., Franco-Cereceda, A., et al. (1986). Specific receptor and cardiovascular effects of calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology*, 119, 381-389.
- Song, I.S., Bunnett, N.W., et al. (2000). Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol*, 9(1), 42-52.
- Spanaus, K.S., Nadal, D., et al. (1997). C-X-C and C-C Chemokines Are Expressed in the Cerebrospinal Fluid in Bacterial Meningitis and Mediate Chemotactic Activity on Peripheral Blood-Derived Polymorphonuclear and Mononuclear Cells In Vitro. *J Immunol*, 158, 1956-1964.
- Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346, 425-434.
- Stanfield, P.R., Nakajima, Y., et al. (1985). Substance P raises neuronal membrane excitability by reducing inward rectification. *Nature*, 315, 498-501.

- Steenbergh, P.H., Hoppener, J.W.M., et al. (1984). Calcitonin gene-related peptide coding sequence is conserved in the human genome and is expressed in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 59(2), 358-360.
- Steenbergh, P.H., Hoppener, J.W.M., et al. (1985). A second human calcitonin/ CGRP gene. *FEBS Lett*, 183, 403-407.
- Stones, R.W., Loesch, A., et al. (1995). Substance P: endothelial localization and pharmacology in the human ovarian vein. *Obstet Gynaecol*, 85, 273-278.
- Sugo, S., Minamino, N., et al. (1994a). Production and secretion of adrenomedullin from vascular smooth muscle cells: augmented production by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun*, 203(1), 719-726.
- Sugo, S., Minamino, N., et al. (1994b). Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun*, 201, 1160-1166.
- Sugo, S., Minamino, N., et al. (1995). Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 207(1), 25-32.
- Suzuki, N., Hardebo, J.E., et al (1989). Origin and pathway of cerebrovascular nerves storing substance P and calcitonin gene-related peptide in rat. *Neuroscience*, 30, 595-604.
- Seybold, V.S. & Abrahams, L.G. (1995). Characterization and regulation of neurokinin1 receptors in primary cultures of rat neonatal spinal neurons. *Neuroscience*, 69(4), 1263-1273.
- Takahashi, H., Watanabe, T.X., et al. (1994). Centrally induced vaspressor and sympathetic responses to a novel endogenous peptide, adrenomedullin, in anesthetized rats. *Am J Hypertens*, 7, 478-482.
- Takahashi, K., Nakayama, M., et al. (2000). Increased Secretion of Adrenomedullin from Cultured Human Astrocytes by Cytokines. *J Neurochemistry*, 74, 99-103.
- Takemoto, H., Kaneda, et al. (1994). Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultured artery endothelial cells: identification of interleukin-6 as an induction factor. *FEBS Lett*, 350, 99-103.
- Tang, Y., Feng Y, et al. (1998). Calcitonin gene-related peptide potentiates LPS-induced IL-6 release from mouse peritoneal macrophages. *J Neuroimmunol*, 84(2), 207-212.
- Tannenbaum, G.S., Goltzman, D. (1985). Calcitonin gene-related peptide mimics calcitonin actions in brain on growth hormone release and feeding. *Endocrinology*, 116, 2685-2687.
- Tchelingerian, J.L., Quinero, J., et al. (1993). Localization of TNF- α , and IL-1- α immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron*, 10, 213-224.
- Thompson, A.W. (1994). *The Cytokine Handbook* Academic Press; Harcourt Brace & Company, Publishers, London.
- Tilg, H., Trehu, E., et al. (1994). Interleukin-6 as an antiinflammatory cytokin: induction of circulating IL-1 Receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83(1), 113-118.
- Torri, H., Hosoi, J., et al. (1997). Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol*, 61(2), 216-223.
- Tran T., Ritchie M.H., Lausch, R.N., Oakes, J.E. (2000). Calcitonin gene-related peptide induces IL-8 synthesis in human corneal epithelial cells. *J Immunol*, 164(8), 4307-4312.
- Tuomanen, E., Tomasz, A., Hengstler, B. & Zak, O. (1985). The relative role of bacterial cell wall and capsule in the induction of inflammation in pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*, 151, 535-540.
- Tuomanen, E., Liu, H, et al. (1985). The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J Infect Dis*, 151(5), 859-868.
- Tuomanen, E.I., Saukkonen K., et al. (1989). Reduction of inflammation, tissue damage, and mortality in bacterial meningitis in rabbits treated with monoclonal antibodies against adhesion-promoting receptors of

- leukocytes. *J Exp Med*, 170, 959-969.
- Turner, A.J., Leug, M.K., & Stefano, G.B. (1994). Degradation of Neuropeptide Signal Molecules in Immunocytes of Vertebrate and Invertebrates. In *Neuropeptides and Immunoregulation*, Scharrer, B., Smith E.M., Stefano G.B. (eds). 152-170.
- Ueda, S., Nishio, K., et al. (1999). Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory reponse syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 160(1), 132-136.
- Unger, J.W., Lange, W. (1991). Immunohistochemical mapping of neurophysins and calcitonin gene-related peptide in the human brainstem and cervical spinal cord. *J Chem Neuroanat*, 4, 299-309.
- van Assche, G., Barbara, G., et al. (1999). Neurotransmitters Modulate Cytokine-Stimulated Interleukin 6 Secretion in Rat Intestinal Smooth Muscle Cells. *Gastroenterology*, 116, 346-353.
- van Rossum, D., Hanisch U.-K., et al. (1997). Neuroanatomical Localization, Pharmacological Characterization and Functions of CGRP, Related Peptides and Their Receptors. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, 21(5), 649-678.
- Veronesi, B., Carter J.D., et al. (1999). Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptide*, 33 (6), 447-456.
- Viac, J., Gueniche, A., et al. (1996). Substance P and keratiocyte activation markers: an in vitro approach. *Arch Dermatol Res*, 288(2), 85-90.
- von Euler, U.S. & Gaddum J.H. (1931). An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (London)*, 72, 74-87.
- von Euler, U.S. & Pernow, B. (1954). Effects of intrventricular administration of substance P. *Nature*, 174, 184.
- Waage, A., Halstensen, A., et al. (1989). Local production of tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6, in meningococcal meningitis. *J Exp Med*, 170, 1859-1867.
- Wang, X., Yue, T.-L., et al. (1995). Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11480-11484.
- Wang, P., Wu, P., et al. (1995). Interleukin (IL-10) inhibits Nuclear Factor κ B (NF κ B) Activation in Human Monocytes. *J Biol Chem*, 270, 9558-9563.
- Weber, J.R., Angstwurm, K., et al. (1995). Anti ICAM-1(CD54) monoclonal antibody reduces inflammatory changes in experimental bacterial meningitis. *J Neuroimmunol*, 63, 63-68.
- Weber, J.R., Angstwurm, K., et al. (1996). The Trigeminal Nerve and Augmentation of Regional Cerebral Blood Flow During Experimental Bacterial Meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16(6), 1319-1324.
- Weigent, D.A. & Blalock, J.E. (1994). Role of Neuropeptides in the Bidirectional Communication. In *Neuropeptides and Immunoregulation*, Scharrer, B., Smith E.M., Stefano G.B.(eds). 14-23.
- Werner, H., Paegelow, I., et al. (1987). Interactions between lymphocytes and neurotransmitter. *Ann N Y Acad Sci*, 496, 312-315.
- Wimalawansa, S.J., Moris, H.R., et al. (1990) Isolation, purification and characterisation of β -hCGRP from human spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun*, 167, 993-1000.
- Yoshimura, A., Lien, E., et al. (1999). Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2. *J Immunol*, 163, 1-5.
- You, J., Gulbenkian, S., et al. (1995). Peptidergic innervation of guinea-pig brain vessels: comparison with immunohistochemistry and in vitro pharmacology in rostrally and caudally located arteries. *J Auton Nerv Syst*, 55(3), 179-188.
- Zilles, K., Rehkämper G (Eds.). (1994 a). Mechanorezeption. In: *ReflexeFunktionelle Neuroanatomie* Springer Verlag Berlin 1994, 249.
- Zilles, K., Rehkämper G (Eds.). (1994 b). Transmitter und Rezeptoren. In: *ReflexeFunktionelle Neuroanatomie*, Springer Verlag Berlin 1994, 385.

Danksagung

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. J. Weber danke für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung. Das Thema auf dem Gebiet der „Neuroinfektiologie“ hat mich von Anfang an begeistert und wird auch in Zukunft mein wissenschaftliches Interesse bestimmen.

Bei Herrn Prof. Dr. U. Dirnagl bedanke ich mich für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung, der Experimentellen Neurologie, und seine Hilfestellung.

Herrn Prof. Dr. K.M. Einhäupl danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Charité.

Bei Frau Dr. D. Freyer und Frau R. Gusinda bedanke ich mich sehr für ihre große Unterstützung bei der Präparation der Zellkulturen und der Durchführung von Experimenten. Des Weiteren sei Frau Dr. F. Freyer sehr gedankt für die wertvollen Hinweise bei der Abfassung der Arbeit.

Frau M. Lebeck sei für ihre stets prompte universelle Hilfsbereitschaft und Unterstützung sowie für ihre Freundschaft gedankt.

Bei Herrn Dr. A. Ziegenhorn, Herrn Dr. A. Meisel und Herrn Dr. J. Prada bedanke ich mich für die Einarbeitung und Beratung bei den molekularbiologischen Methoden.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Oehme vom Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie bedanke ich mich für wertvolle Anregungen bezüglich der Neuropeptid-Pharmakologie in dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. R. Schumann vom Institut für Mikrobiologie der Charité bedanke ich mich für die Präparation der Zellwände von *Streptococcus pneumoniae*.

Für die Überlassung des DNA-Kontrollfragmentes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volk vom Institut für Immunologie der Charité.

Monsieur X. Edmons-Alt von Sanofi Recherche in Montpellier/ Frankreich danke für die Bereitstellung des NK-1 Antagonisten SR140333.

Großer Dank gilt Herrn Prof. F. Nyberg und seinen Mitarbeitern vom Division of Biological Dependence on Drug Research, Department of Pharmacology, University of Uppsala / Schweden, die mir durch einen Arbeitsaufenthalt in ihrem Labor die Einarbeitung in die

Technik und die Durchführung von Radioimmunoassays ermöglichten.

Meinem Freund Udo Wiegand danke ich für die persönliche Unterstützung und die gemeinsamen freizeithchen Aktivitäten, die zu einem wohlwollendem Ausgleich während dieser Zeit geführt haben. Es sei ihm weiterhin gedankt für die Formatierung und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch meiner Schwester Henriette Sehmsdorf sei für das Korrekturlesen und Unterrichten in der Neuen Deutschen Rechtschreibung gedankt.

Allen nicht hier nicht namentlich genannten Freunden, Bekannten und Verwandten sei für ihre Begleitung während dieser Zeit gedankt.

Mein ganz großer Dank ist an meine Eltern gerichtet, die mir immer geistig, moralisch und finanziell zur Seite standen.

Publikationen

Lautenschlager, M., Onufriev, M.V., Gulyaeva, NV, Harms, C., Freyer, D., Sehmsdorf, U.S., Ruscher, K., Moiseeva YV, Arnswald, A. Victorov, I., Dirnagl, U., Weber J.R., Hörtnagl H. Role of nitric oxide in the ethylcholine aziridinium model of delayed apoptotic neurodegeneration in vivo and in vitro. *Neuroscience* (2000), 97(2):383-393.

Präsentationen (publizierte Abstracts)

1. Sehmsdorf U-S., Freyer D., Meisel, A. Dirnagl, U. Weber J.R. Effect of SP and CGRP on the cytokine mRNA Expression from brain endothelial cell upon stimulation with cell components from *Streptococcus pneumonia* (PCW). *International Tachykinin Conference Abstract, 75, 1997.*
2. Freyer, D., Sehmsdorf, U.-S., Ziegenhorn, A., Manz R., Meisel, A., Angstwurm K., Lautenschlager, M., Dirnagl, U., Ransmayr, G., Weber J.R.. Effect of SP and CGRP on TNF- α and NO release from brain cells upon stimulation with cell wall components from *S. pneum.*, *Soc Neurosci Abst*, 23(1)p 994, 1997
3. Lautenschlager, M., Freyer, D., Sehmsdorf, U.-S., Weber J.R., Hörtnagl, H.. Role of cytokines in the cascade of neurodegeneration induced by the cholinotoxin AF64A in vitro and in vivo., *Soc Neurosci Abst*, 23(2) p 1985, 1997
4. Sehmsdorf, U.-S., Freyer, D., Hildebrandt, M., Weber, J.R. Effect of CGRP and pneumococcal cell walls on Adrenomedulin and TNF- α expression in brain microvascular endothelial cells., *Neuropeptide Conference Abst. 2001*, in press

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, April 2001