

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Klaus Viktor Toyka

UNTERSUCHUNGEN ZUR PHARMAKOLOGISCHEN
HEMMUNG DER ZYTOKIN-INDUZIERBAREN
NO-SYNTHESE
IN KULTIVierten MIKROGLIA-ZELLEN UND
MAKROPHAGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Barbara Christiane Schröder (geb. Müller)
aus Saarbrücken

Würzburg, Juli 2002

Referent: Professor Dr. med. K. V. Toyka

Koreferent: Professor Dr. med. G. Stoll

Dekan: Professor Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2003

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 NO und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	7
2. Materialien und Methoden	9
2.1 Zellkulturen	9
2.2 Versuchsanordnung	11
2.3 Nitritbestimmung in Zellkulturüberständen	11
2.4 Stimulatoren	13
2.5 Inhibitor	14
2.6 Getestete mögliche Hemmstoffe der NO-Synthase	15
2.6.1 Zytokine	15
2.6.2 Wachstumsfaktoren	17
2.6.3 Neuropeptide und Peptidtransmitter	21
2.6.4 Chemokine	24
2.6.5 Tyrosinkinase-Inhibitoren	25
2.7 Vitalitätstest	27
2.8 Statistische Auswertung	28
3. Ergebnisse	31
3.1 Nitritproduktion von J774A.1, Peritonealmakrophagen, Mikroglia und Astrozyten nach Stimulation mit LPS und γ -IFN	31
3.2 Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren, Neuropeptide und Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Nitritproduktion	32
3.3 Hemmung der Nitritproduktion durch Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat	37

4. Diskussion	45
4.1 MDHC hemmt die Zytokin-induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Mikroglia und Makrophagen	45
4.2 Tyrosin-Phosphorylierung erfolgt als Reaktion der Zelle auf Rezeptor-Ligand-Interaktionen	48
4.3 γ -IFN induziert in unterschiedlichen Zellen jeweils verschiedene Signaltransduktionsmechanismen	50
4.4 Genistein, Lavendustin A und Tyrphostin hatten keine hemmende Wirkung auf die iNOS in Mausmakrophagen und Rattenmikrogliazellen	51
4.5 Einfluß des Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine auf den Oxidative Burst und andere Zellfunktionen	54
4.6 Fehlende Hemmung der iNOS durch andere Substanzen	56
5. Zusammenfassung	58
6. Literatur	60
7. Danksagung	
8. Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

γ -IFN	γ -Interferon
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis Of Variances
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
AT	Adoptiver Transfer
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CAM	Cell Adhesion molecule
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EAN	Experimentelle Autoimmune Neuritis
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
Glc-6P-Dehydrogenase	Glukose-6 Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IGF	Insulinlike Growth Factor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Interferon-Regulatory Factor
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor

LNGFR	Low Affinity NGF Receptor
L-NMMA	L-N-Monomethyl-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	basisches Myelinprotein
MCP	Monocyte Chemoattractive Protein
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MDHC	Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat
MHC-Antigen	Haupthistokompatibilitätsantigen
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MPS	Monozyten-Makrophagen-System
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MS	Multiple Sklerose
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAME	Nitro-Arginin- Methyl ester
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NNA	N-Nitroarginin
nNOS	neuronale NO-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
PAF	Platelet Activating Factor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC12-Zellen	Phäochromozytomzellen
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PNS	Peripheres Nervensystem
PYY	Peptid YY
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
SP	Substanz P
STAT	Signal Transduction and Activator of Transcription
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
ZNS	Zentralnervensystem

Meiner Familie gewidmet

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Makrophagen und Mikroglia spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung entzündlicher demyelinisierender ZNS-Erkrankungen. Sie wirken dabei mit über die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (Interleukine, Proteasen), die Expression von Histokompatibilitätsantigenen (MHC-Klasse-I und -II Antigenen) zur Aktivierung von T-Lymphozyten, die Aktivierung von Komplementfaktoren und die Freisetzung zytotoxischer Substanzen wie Sauerstoffradikalen, Proteasen und Stickoxid (NO) (69, 155). Mikroglia, 1932 erstmals von Rio Hortega als "retikuloendotheliales System im zentralen Nervensystem (ZNS)" bezeichnet, sind die ersten Zellen, die am Entzündungsort oder am Ort einer ZNS-Verletzung agieren. Besonders intensiv untersucht wurde die Mikroglia-Aktivierung in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Dabei wird in Nagetieren durch die Injektion von Myelin-Antigenen des ZNS eine hochakute Entzündung des zentralen Nervensystems induziert. Bei der EAE proliferiert die Mikroglia frühzeitig und exprimiert MHC-Klasse-I und -II Antigene sowie Zelladhäsionsmoleküle. Außerdem setzt sie Sauerstoffradikale und Zytokine frei und wird phagozytotisch aktiv. Die freigesetzten Zytokine Interleukin-1(IL-1), IL-6, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), γ -Interferon (γ -IFN), Transforming Growth Faktor- β (TGF- β) aktivieren Astrozyten zur Proliferation und regulieren die Immunantwort (59).

Neonatale Mikroglia synthetisiert in Zellkulturen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) oder γ -IFN hohe Konzentrationen an NO (14, 29, 55, 140, 228). Substrat für die NO-Synthase (NOS) ist das L-Arginin. Neben der Ca^{2+} -abhängigen, konstitutiv exprimierten NOS der Astrozyten verfügen sowohl Mikroglia als auch Astrozyten über eine zytokin-induzierbare NO-Synthase, welche nur nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN exprimiert wird (29, 55, 228 u.a.). MacMicking et al. (1992) fanden in perivaskulären Läsionen von Ratten mit EAE viele Blutmonozyten und polymorphkernige Leukozyten, die Sauerstoff- und Stickstoffradikale produzierten (126). Diese Substanzen sind, in hoher Konzentration, für Zellen und Gewebe toxisch.

Stickoxid ist ein labiles Gas, das nach 6-10 Sekunden in Anwesenheit von Wasser oder Sauerstoff in seine stabileren Abkömmlinge Nitrit und Nitrat umgewandelt wird. Durch ein freies Elektron ist es chemisch ein freies Radikal und hochreaktiv. Seit langem ist bekannt, daß Bakterien NO enthalten; seine Wirkung auf Säugetiere und Menschen wird erst seit jüngerer Zeit ausführlich untersucht.

Eine endogene Nitratproduktion wurde beim Menschen erstmals 1916 von Mitchell und Mitarbeitern nachgewiesen (136). Schon damals vermuteten die Autoren, daß es neben der Nahrung noch endogene Nitratquellen geben mußte, da bei Urinuntersuchungen von Mensch, Ratte und Schwein die NO-Ausscheidung nicht mit der aufgenommenen Menge korrelierte. Später wurden Nitrate auch in Speichel und Magensaft des Menschen festgestellt (64). Die höchste Konzentration fand sich jedoch im Urin, sodaß angenommen wurde, NO entstünde einzig als Abbauprodukt der Nahrung. Tannenbaum et al. konnten diese Vermutung anhand von Untersuchungen an Ratten, die wenig Nitrate mit der Nahrung aufnahmen und dennoch hohe Nitratmengen ausschieden, 1981 widerlegen (197, 211). Ein Zusammenhang mit infektiösen Erkrankungen wurde hergestellt. Wagner et al. injizierten bakterielle Endotoxine in Ratten, woraufhin die Nitratexkretion zunahm (212). Stuehr und Marletta zeigten 1985, daß es Makrophagen sind, die die Endotoxin-induzierte Nitratproduktion ausüben (191). Anhand verschiedener Makrophagenzelllinien stellten Stuehr und Marletta 1987 fest, daß die Synthese von Nitrit und Nitrat durch LPS sowie durch γ -IFN gesteigert werden kann, und daß NO ein Zwischenprodukt dieses Syntheseweges ist. Außerdem konnten sie zeigen, daß Makrophagen in Zellkulturen in Abwesenheit der Aminosäure L-Arginin kein Nitrit produzieren können (129). Auch die tumorizide Eigenschaft der Makrophagen ging bei Fehlen dieser Aminosäure verloren (192). Dies war ein Hinweis darauf, daß NO bei der Tumorzelltoxizität eine wichtige Rolle spielt (79). Das freigesetzte NO hemmt die Atmungskette, den Elektronentransport und die DNA-Synthese in den Tumorzellen und führt somit zu deren Untergang. Stuehr und Nathan fanden, daß die stabileren Produkte Nitrit und Nitrat hierzu nicht in der Lage waren (193).

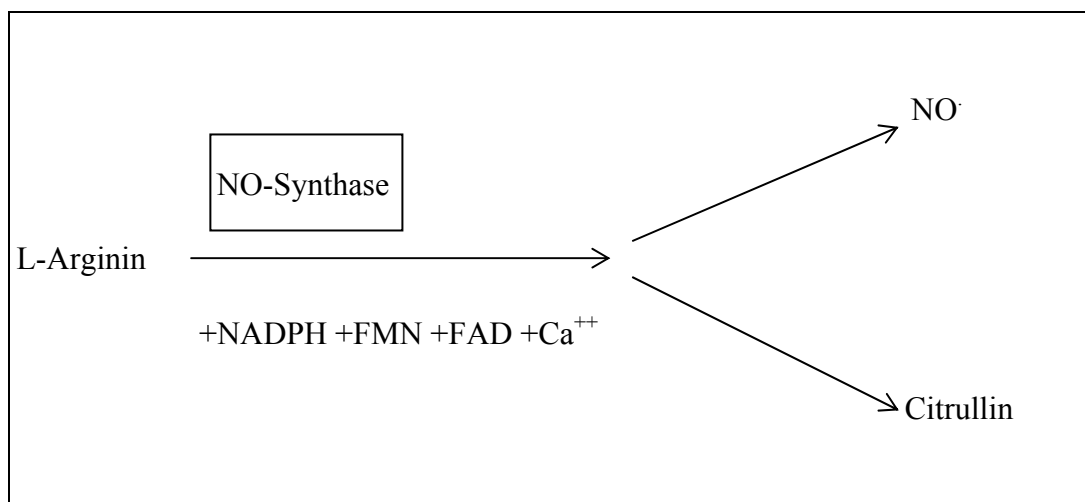
Positive Effekte zeigten sich durch die Entdeckung, daß NO für die Dilatation von Blutgefäßen verantwortlich ist. Neben der Tumor- und Bakterien-Toxizität von NO konnte gezeigt werden, daß NO auch als Neurotransmitter im Gehirn und im autonomen Nervensystem (z. B. Plexus myentericus) eine physiologische Rolle spielt. Außerdem

ist NO im Gefäßsystem ein wichtiger Vasodilatator.

Für die Aufklärung der Rolle von NO wurde 1998 Furchgott, Ignarro und Murad der Nobelpreis für Medizin und Physiologie verliehen.

Es gibt drei verschiedene NO-Synthasen. Die Typ-I-NOS (nNOS) wird in Nervenzellen gebildet; im Nervensystem fungiert NO als Neurotransmitter. Die Typ-II-NOS (iNOS) wird vor allem in Makrophagen gebildet, hier dient NO als zytotoxisches Agens. Die Typ-III-NOS (eNOS) wird im Endothel der Gefäßwände gebildet, hier dient NO als Vasodilatator. Allen NO-Synthasen gemeinsam ist das Substrat L-Arginin. Alle Formen bilden NO und Citrullin in äquivalenter Stöchiometrie und alle benötigen als Elektronendonator NADPH. (Abb. 1)

Abbildung. 1: Biochemie der NO-Bildung aus L-Arginin



Während die in Neuronen und Endothel vorkommenden NOS Ca⁺⁺-abhängig arbeiten, benötigt die Makrophagen-NOS (Typ-II-NOS) kein freies Ca⁺⁺ (18). Die Neuronen- und Endothel-NOS sind Calmodulin-abhängige Enzyme, die reversibel durch freies Ca⁺⁺ aktiviert werden. Hieraus resultiert eine schnelle Produktion kleiner Mengen an NO, die in Abwesenheit von Ca⁺⁺ sistiert (17). Im Gegensatz zur NOS in Makrophagen und Mikroglia kann die Neuronen-NOS nicht durch LPS stimuliert werden (55).

Makrophagen und Mikroglia produzieren nach Induktion durch Zytokine große Mengen an zytokin-induzierbarer NOS, wobei das Enzym unabhängig von freiem Ca^{++} ständig viel NO freisetzt (129).

Mittlerweile sind beim Menschen und in Mäusen jeweils alle drei Formen der NO-Synthase kloniert und sequenziert worden (Tab. 9), die jeweils gewebespezifisch reguliert werden (141, 222) .

Tabelle 1: Klassifikation der NO-Synthasen

Name	Typ	Ca^{++}-abhängig	Zytokin-induzierbar	Genort beim Menschen
Neuronale NOS	I	ja	Nein	12q24.2
Zytokin-induzierbare NOS	II	nein	Ja	17q11.2
endotheliale NOS	III	ja	Teilweise	7q35.36

Das Vorkommen von NO im ZNS wurde 1989 von Moncada nachgewiesen. Neuronales NO wird freigesetzt, wenn Glutamat an das Eisen des NMDA-Rezeptors des Neurons bindet (187). Diese Bindung führt zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle. Das intrazelluläre Kalzium bindet Calmodulin und dieser Komplex aktiviert die NO-Synthase, welche L-Arginin in NO und Citrullin umwandelt. Erstaunlicherweise gehen die NO-produzierenden Neurone selbst nicht zugrunde, sondern allenfalls die Zellen in der Umgebung. NO scheint für die Glutamat-vermittelte Zytotoxizität verantwortlich zu sein, die bei verschiedenen ZNS-Erkrankungen, z. B. zerebralen Ischämien, intrazerebralen Blutungen oder Schädel-Hirn-Traumata, auftritt. NO hat also im ZNS sowohl eine neurotoxische Wirkung als auch eine physiologische Funktion als Neurotransmitter. Die toxischen Wirkungen werden vermutlich durch die Reaktion des NO mit Sauerstoffradikalen zu Peroxynitrit sowie durch die inhibierende Bindung an Enzyme mit Eisen-/Schwefel-Ionen vermittelt (174). NO alleine kann je nach Redoxzustand der Zelle sogar neuroprotektive Funktionen haben (116).

Im ZNS besitzen verschiedene Zellen die Fähigkeit, NO zu synthetisieren. Neurone verfügen über die sogenannte nNOS (neuronal NOS), aber nicht über die zytokin-induzierbare NOS. In Astrozyten wurden wie in Endothelzellen und Makrophagen beide Formen beschrieben (140). Demgegenüber konnte in Mikroglia bislang nur die iNOS nachgewiesen werden (140). Auch Oligodendrozyten, die im ZNS das Myelin bilden, können nach Zytokin-Stimulation iNOS exprimieren (133). Ebenso wurde in Schwann'schen Zellen, den Myelin-bildenden Zellen des peripheren Nervensystems, eine durch γ -IFN und TNF- α induzierbare NO-Synthase beschrieben, welche auch charakteristischerweise durch NMMA gehemmt werden kann (62).

NO wirkt zytotoxisch, wenn es in höheren Konzentrationen anfällt (18) und soll eine Rolle in der Pathogenese von Zelltod nach zerebralen Ischämien und demyelinisierenden Erkrankungen spielen. Auf Zellebene hemmt NO Enzyme, die an der DNA-Synthese, am mitochondrialen Elektronentransport und am Zitronensäurezyklus beteiligt sind (11). Das von der Mikroglia synthetisierte NO führt zum Absterben der Oligodendrozyten (132), den Myelin produzierenden Zellen des ZNS, die bei der Multiplen Sklerose geschädigt werden. In Nervenzellkulturen mediiert NO die Neurotoxizität zusammen mit O_2^- (15). In einem Schlaganfallmodell von Mäusen mit Unterbindung der A. cerebri media konnte die intraperitoneale Applikation von Nitroarginin (einem NOS-Inhibitor) das Ausmaß des Insultareals begrenzen. Auch bei der HIV-Enzephalopathie spielt NO vermutlich eine Rolle (23). Nathan beschreibt die unterschiedlichen Wirkung der iNOS-Expression bei verschiedenen Infektionskrankheiten auf den Wirtsorganismus (143). In einer Reihe von Untersuchungen an Mäusen, denen das Gen für die zytokin-induzierbare NO-Synthase entfernt worden war, wurde festgestellt, daß die iNOS-Expression den infizierten Organismus schädigen, zur Verschlimmerung der Erkrankung beitragen, ohne Einfluß auf den Wirt sein oder sogar eine protektive Wirkung haben kann (143).

Eine Korrelation zwischen erhöhtem iNOS-mRNA-Spiegel, enzymatischer Aktivität und der Konzentration an NO im Gehirn bei ZNS-Erkrankungen (experimentelle Tollwut, Borna oder EAE), die bei Lewis- und Sprague-Dawley-Ratten gefunden wurde, läßt auf eine erhöhte Aktivität der iNOS bei diesen Erkrankungen schließen (81, 116). Lag der NO-Spiegel im gesunden Gehirn bei $1\mu\text{M}$, so fand sich im erkrankten Gehirn ein Anstieg auf $30\mu\text{M}$. Auch im menschlichen Gehirn fanden sich in demyelinisierten Regionen von MS-Patienten wesentlich höhere Konzentrationen an

iNOS-mRNA als in Gehirnen von Patienten ohne ZNS-Läsionen. Selbst wenn diese Entdeckung nicht MS-spezifisch zu sein scheint, gibt sie doch Anlaß zu der Annahme, daß NO auch bei der Pathogenese der MS des Menschen eine Rolle spielt (13).

1.2 NO und Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell für Autoimmunerkrankungen des ZNS, speziell die Multiple Sklerose. Hierbei werden dem Versuchstier basisches Myelinprotein (MBP-EAE), oder MBP-sensibilisierte T-Lymphozyten (adoptive Transfer-EAE) injiziert (155, 226). Nach Immunisierung mit MBP werden MBP-sensibilisierte T-Zellen in peripherem Lymphgewebe stimuliert, wo sie proliferieren (59). Diese T-Zellen heften sich an Hirngefäße und setzen Zytokine frei, welche ihrerseits die Expression von Zelladhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Endothelzellen stimulieren. Durch Anheftung an entsprechende Zelladhäsionsmoleküle können die T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und in das ZNS eindringen (59). Hierauf beginnt die Mikroglia, etwa ab dem 4.Tag, MHC-Klasse-II- Antigene zu exprimieren und zu proliferieren. Des weiteren generieren Mikrogliazellen verschiedene proinflammatorische Moleküle, wie reaktive Sauerstoffabkömmlinge (H_2O_2 , O_2^- , OH^-), NO-Metaboliten, Eikosanoide, Komplementfaktoren, Proteasen, Zytokine und vasoaktive Amine (69).

Die von Mikroglia und Makrophagen freigesetzten Zytokine, wie IL-1, IL-6, TNF- α , γ -IFN und TGF- β aktivieren Astrozyten und Lymphozyten. IL-1 hemmt die Proliferation und Differenzierung der Oligodendrozyten in vitro, während TNF- α zytotoxisch auf myelinisierende Oligodendrozyten wirkt. So kommt den Gehirnmakrophagen in der EAE aufgrund ihrer proinflammatorischen und toxischen Wirkungen eine wichtige Rolle zu (85).

Die NO-Produktion in Mikrogliazellen erfolgt durch die zytokin-induzierbare NO-Synthase, welche erst nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN exprimiert wird (29, 55, 228). Als hemmbar erwies sich die NOS in vitro und in vivo durch L-N-Monomethylarginin (L-NMMA, einen kompetitiven NOS-Hemmstoff) sowie durch Aminoguanidin (einen selektiven Inhibitor der iNOS), Nitro-Arginin-Methylester (NAME) und N-Nitroarginin (NNA). Diese Inhibitoren haben unterschiedlichen Einfluß auf die Ausprägung der EAE und EAN (Experimentelle Autoimmune Neuritis) in Lewis-Ratten (226). Während das Erkrankungsausmaß der AT-EAN durch NMMA und, weniger, durch NAME gemildert werden konnte, wurde die Myelin-EAN hierdurch nicht beeinflusst. Bei der AT-EAE sowie der MBP-EAE hatte keiner der NOS-Inhibitoren einen protektiven Effekt. Aminoguanidin hatte sogar eine

geringgradige Verschlechterung des Erkrankungsbildes der MBP-induzierten EAE zur Folge. Auch Ruuls und Mitarbeiter fanden eine leichte Verstärkung der EAE nach Applikation von NOS-Inhibitoren (165). Fenyk-Melody et al. fanden eine sehr eindeutige Verstärkung der EAE bei Mäusen, denen das Gen für die zytokin-induzierbare NOS gentechnisch entfernt worden war (53). Demgegenüber gelang es Cross et al. (1994) durch Aminoguanidin die Ausprägung der EAE in Mäusen abzuschwächen und den Erkrankungsbeginn hinauszuzögern (34).

Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse muß von einer wesentlichen Rolle der iNOS bei der Pathogenese der EAE und EAN ausgegangen werden, wobei die Rolle als Hemmer oder Induktor der Krankheitsentwicklung je nach verwendetem Tiermodell unterschiedlich zu sein scheint.

Leider ist keiner der bislang in Tiermodellen oder Zellkulturen untersuchten iNOS-Hemmstoffe spezifisch wirksam, sodaß neben der iNOS auch andere Enzyme gehemmt werden. Wir suchten daher nach neuen Hemmstoffen der NO-Produktion in Mikroglia und Makrophagen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Neurotransmitter, Chemokine und Tyrosinkinaseinhibitoren auf ihre Potenz zur Hemmung der induzierbaren NO-Synthase untersucht. Zielsetzung war es, einen Inhibitor der zytokin-induzierbaren NO-Synthase zu finden, der möglicherweise in der Zukunft auch zur therapeutischen Anwendung kommen kann.

2. Materialien und Methoden

2.1 Zellkulturen

Alle Zellkulturreagenzien stammten von der Firma Gibco (Eggenstein).

A. Gewebsmakrophagen der Maus (J774 A.1-Zellen, eine Sarkom-Zelllinie, American Type Culture Collection, USA) wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) +10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert (37° C, 5 % CO₂).

B. Peritonealmakrophagen von Lewis-Ratten: Pro Versuch wurden ca. 2 Tiere im Alter von 2 bis 4 Monaten benötigt. Die Ratten wurden durch Äthernarkose eingeschläfert, die Makrophagen mit eisgekühlter phosphatgepufferter isotoner Kochsalzlösung (PBS, pH 7,4), die in das Peritoneum injiziert wurde, losgelöst, und die Zellsuspension nach ca. einer Minute mit einer sterilen Pipette wieder abgezogen. Die gewonnenen gemischten Peritonealzellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium (DMEM + 10% FCS +1% Natriumpyruvat +1% Nichtessentielle Aminosäuren +1% Penicillin/ Streptomycin) in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Falcon, Hamburg) suspendiert und 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Varifuge K, Heraeus Christ, Köln). Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert, in eine mit FCS beschichtete Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) gefüllt und für ca. 1 Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Der vorwiegend Granulozyten enthaltende Überstand wurde anschließend abgesaugt, die adhärenen Makrophagen mit 5 ml angewärmtem PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit kaltem EDTA (5 mM) in PBS pH 7,4 vom Flaschenboden durch kräftiges Schütteln gelöst. Die so gewonnenen Zellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in DMEM ohne Phenolrot +10% FCS + 1,75 g Glucose (Sigma, Deisenhofen) + 200 mM Glutamin (Seromed, Stuttgart) +15 mM HEPES-Puffer (Sigma) gewaschen und in 1 ml resuspendiert. Eine Zellkonzentration von $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer eingestellt. Die so gewonnenen Makrophagen-Kulturen bestanden zu etwa 90 % aus Makrophagen, der Rest waren neutrophile Granulozyten und Zellen des Peritoneal-Epithels.

C. Mikroglia von neugeborenen Lewis-Ratten aus der Zucht der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg und von Charles River, Schweinfurt:

Pro Versuch wurden 6-15 höchstens 2 Tage alte Tiere benötigt. Sie wurden in Äthernarkose getötet und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Der Schädel wurde jeweils mit sterilem Präparationsbesteck eröffnet und das Gehirn in eine mit Kulturmedium (DMEM + 10% FCS + 2% Glutamin 200 mM + 2% Glukoselösung 25%) gefüllte Petrischale gegeben. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Präparationsmikroskop (Olympus, München).

Die Großhirnhemisphären wurden vorsichtig vom Hirnstamm gelöst und in eine frische, mit Kulturmedium (10ml) gefüllte Petrischale gegeben. Anschließend erfolgte die Abpräparation der Meningen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Gehirne dann mit einer Federschere zerkleinert und in 20 ml eisgekühltes Medium aufgenommen, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert (4°C). Das Zellpellet wurde in 20 ml EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) ohne Ca^{++} und Mg^{++} (GIBCO) resuspendiert, durch einen 130 μm -Filter gegeben und erneut 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml EBSS ohne Ca^{++} und Mg^{++} (GIBCO) mit Trypsin 0,1 % und DNase 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Boehringer, Ingelheim) unter kräftigem Schütteln resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde die Trypsin/EDTA-Reaktion gestoppt, die Zellen in Medium gewaschen und in mit Poly-L-Ornithin (Sigma) beschichtete 260 ml-Zellkulturflaschen aufgeteilt (pro Flasche etwa 2 Gehirne in 10 ml Zellkulturmedium). Die Zellen wurden ca. 10 -14 Tage im Brutschrank (37°C/ 5% CO_2) inkubiert, wobei die Adhärenz innerhalb der ersten 4 Tage erfolgte, in denen die Flaschen daher nicht bewegt wurden. Ab Tag 4 erfolgte in dreitägigen Abständen ein Mediumwechsel, wobei auch die Reife der Zellen beurteilt wurde. Ab dem 6. Tag hatte sich am Boden ein dichtes Zell-Monolayer gebildet und bis zum 10.-12. Tag waren die Zellen vollständig ausgewachsen und konnten verwendet werden. Hierzu wurden die Kulturflaschen über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Drehschüttler (TH 25 SM, Edm. Bühler, Tübingen) bei 175 U/min geschüttelt und die abgelösten Zellen (Mikroglia und Oligodendroglia) nach einmaligem Waschen in FCS-beschichtete Zellkulturflaschen gegeben, wo die Mikroglia innerhalb 1 bis 2 Stunden erneut adhären wurde, während die Oligodendroglia im Überstand verblieb und abgesaugt werden konnte. Mit den adhären Zellen wurde wie oben für die

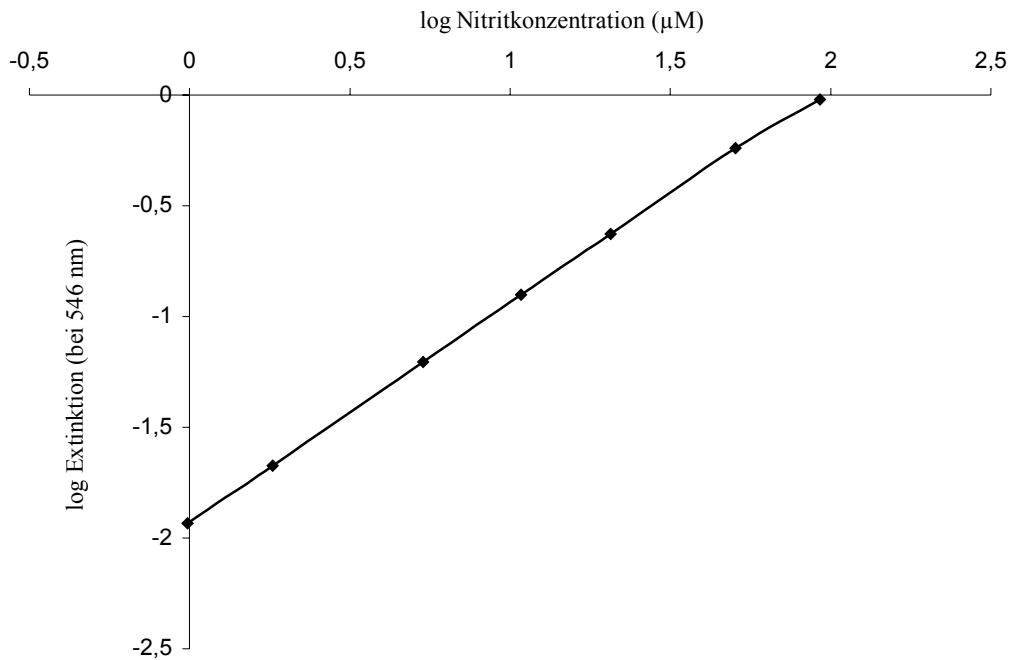
Peritoneal-makrophagen beschrieben verfahren. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde in Zellkulturmedium ohne Phenolrot die Zellkonzentration auf $2,2 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

D. Astrozyten, die in den Flaschen verbliebenen Zellen, wurden ebenfalls mit EDTA vom Boden abgelöst und die Zellzahl auf $2,2 \times 10^5$ /ml eingestellt. Diese Präparation enthält etwa 90 % Astrozyten und etwa 10 % kontaminierende Mikroglia-Zellen.

2.2 Versuchsanordnung: Die Zellsuspension wurde in 96-Loch -Microtiterplatten (Nunc, Wiesbaden) pipettiert, so daß sich pro Vertiefung in 180µl Zellkulturmedium 40000 Zellen befanden. Es wurden jeweils Triplikate angefertigt. Die Stimulatoren und Inhibitoren wurden entweder zeitgleich oder im Abstand von 12 Stunden (Inhibitor vor Induktor) zugegeben. Sämtliche Inhibitoren und Induktoren wurden in DMEM ohne Phenolrot unter Zusatz von 10% FCS, 1,75 g/l Glukose, 1% Glutamin (200 mM), 1,5 % HEPES-Puffer (15 mM) hergestellt.

2.3 Nitritbestimmung in Zellkulturüberständen: Hierzu wurden die Überstände (100µl) 72 Stunden nach dem Ansatz in frische Mikrotiterplatten nach demselben Plan übertragen und pro Vertiefung die gleiche Menge frisch angesetztes Griess-Reagenz (zu gleichen Teilen 1 Gew.-% Sulfanilamid und 0,1 Gew.-% Naphthylethylendiamindihydrochlorid, beides von Sigma in Aqua dest.) zugesetzt. In Anwesenheit von Nitrit bilden sich rote Farbstoffkomplexe (66 64), deren Extinktion nach 10 Minuten Inkubation (Raumtemperatur, im Dunkeln) bei 546 nm im ELISA-Reader (Flow, Meckenheim) gemessen wurde. Die Nitritstandardkurve wurde jeweils mit Natriumnitrit (100 mM/l, Serva) in Dreifachbestimmungen mit Konzentrationen von 1000, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0 µM/l erstellt, deren Extinktion nach Zugabe von gleichen Teilen Griess-Reagenz gemessen wurde. Zur Erstellung der Standardgeraden wurden die Mittelwerte der Extinktion der Dreifachbestimmungen durch Regressionsanalyse in Relation zur Konzentration gestellt (Beispiel in Abb. 2). Es wurde ein doppelt logarithmischer Maßstab gewählt, um einen linearen Verlauf der Kurve zu erhalten.

Abbildung 2: Nitrit-Standardkurve



Beispiel für Regressionsanalyse dieser Standardgerade:

Konstante (Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der y-Achse): -1,929

Standardabweichung Y: 0,016

R²: 1,000

x-Koeffizient (Steigung der Regressionsgeraden im doppelt logarithmischen System): 1,003

Standardabweichung d. Koeffizienten: 0,009

Durch Einsetzen in die Geradengleichung $y = ax + b$ ergibt sich beispielsweise für eine mittlere Extinktion (Stimulation mit LPS und γ -IFN) von 0,562, falls

$$\log 0,562 = -0,250$$

$$-0,250 = 1,003x + (-1,929)$$

$$x = (-0,250 + 1,929)/1,003 = \log(\text{Konzentration}) = \log 1,674 = \underline{\underline{47 \mu\text{M}}}; \text{ mit}$$

y: Mittelwert der Extinktion

a: x-Koeffizient

b: y-Achsenabschnitt

x: Konzentration (μM)

2.4 Stimulatoren

Zur Stimulation der zytokin-induzierbaren NO-Synthase setzten wir Lipopolysaccharid (LPS) sowie γ -Interferon (γ -IFN) ein. LPS wurde in einer Konzentration von 1 μ M/ml eingesetzt, was der in anderen Arbeiten zur Stimulation der iNOS in Makrophagen beschriebenen Konzentration entspricht (z. B. 192, 193, 212). γ -IFN kam in der nach der Literatur idealen Konzentration von 100 U/ml zur Anwendung (191, 192, 228). Als Kontrollinhibitor wurde N-Monomethyl-L-Arginin (NMMA) in einer Konzentration von 100 μ M/l verwendet.

- 1. Lipopolysaccharid** (LPS aus *Escherichia coli* Stamm 0127:B8; Sigma, Deisenhofen), Hauptbestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, spielt eine große Rolle bei der Entstehung entzündlicher Reaktionen, wobei es als Endotoxin fungiert. Die Wirkung erfolgt über die Stimulation phagozytierender Zellen (204, 214). Es kommt hierdurch zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6 und TNF- α . Im ZNS kommt es durch i.v. Applikation von LPS innerhalb weniger Stunden zur Aktivierung von Mikroglia im Hirnstamm, Thalamus und vorderen Hypothalamus von Ratten, was sich in einer morphologischen Umformung der Zellen zu runden, Makrophagen-ähnlichen Zellen zeigt (25). Die Stimulation von Makrophagen führt über Signalübertragung auf den Zellkern zur Induktion der NO-Synthase (55).
- 2. γ -IFN** (rekombinantes Gamma-Interferon von Ratten; Holland Biotechnology, Leiden), 1965 von Wheelock entdeckt, wird nach mitogener oder antigener Stimulation von T-Zellen exprimiert. Durch Steigerung der Effektorzellfunktion bei Makrophagen und NK-Zellen übernimmt es immunregulatorische Funktionen (43). Auch γ -Interferon-vermittelte Stimulation von Makrophagen führt zur Expression der NO-Synthase und somit zur NO-Produktion (187).

2.5 Inhibitor

NMMA, N-Monomethyl-L-Arginin (Calbiochem, Frankfurt), ein methyliertes Struktur analogon des NOS-Substrates L-Arginin und Hemmstoff vor allem der zytokininduzierten NO-Synthase. NMMA wurde jeweils als Kontrollsubstanz in allen Experimenten mitgeführt, um sicherzustellen, daß die NO-Produktion der Zellkulturen auf die Aktivität von NO-Synthasen zurückzuführen ist (79).

2.6 Getestete mögliche Hemmstoffe der NO-Synthase

Eine Übersicht sowie Herstellerangaben findet sich in Tabelle 2 am Ende dieses Abschnitts.

2.6.1 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide, welche von verschiedenen Zellen gebildet werden. Beispielsweise vermitteln stimulierte Makrophagen über sie die Abwehrreaktion bei bakteriellen Infekten. In dieser Arbeit wurden aus dieser Substanzgruppe Interleukin 6, Interleukin 10 und der Leukämie- inhibierende Faktor auf eine Hemmung der zytokininduzierbaren NO-Synthase getestet.

Interleukin 6 (IL-6) in Konzentrationen von 0,1 -100 ng/ml. IL-6, unter vielen Namen bekannt (u. a. B- Zelldifferenzierungsfaktor, B- Zellstimulationsfaktor 2, zytolytischer Differenzierungsfaktor für T-Lymphozyten oder Thrombopoetin) fördert die Antikörperbildung in B-Lymphozyten, wird von T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert (102). Weitere Funktionen sind die T-Zell-Aktivierung und die Nervenzell-Differenzierung (169). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Regulation der Nitrit-Produktion in Makrophagen-ähnlichen Zellen (Myeloische-Leukämie-Zellen), wobei in Konzentrationen von > 50 U/ml die Nitritproduktion induziert wurde (196).

Auch Mikroglia kann IL-6 freisetzen, was die Astrozytenproliferation und die Neuvaskularisation bei Hirntraumen induziert (100). Die Wirkung von IL-6, das gemeinsam mit LIF, Oncostatin und CNTF als Signaltransduktor das Glykoprotein gp 130 verwendet, kann durch Blockade dieses Rezeptorteils aufgehoben werden. Hierdurch können hämatopoetische und neurotrophe Effekte, die durch diese Zytokine vermittelt werden, blockiert werden (195).

Interleukin 10 (IL-10) wurde in Konzentrationen von 0,1 -100 ng/ml getestet. IL-10 wurde zunächst aufgrund seiner T-Zell-stimulierenden Wirkung als "B-cell-derived T-cell growth factor" bezeichnet (194). IL-10 hemmt die LPS- bzw. γ -IFN-induzierte Produktion von Zytokinen, wie IL-1, IL-6, TNF- α in T-Helfer-2-Zellen (54). Die Produktion von IL-10 durch LPS-stimulierte Monozyten kann von IL-4 gehemmt

werden. Außerdem kann durch Zugabe von IL-10 zu LPS-aktivierten Monozyten die Synthese von IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF und G-CSF auf Transkriptionsebene inhibiert werden (42). Auch die Produktion von NO durch γ -IFN-stimulierte Makrophagen, die von endogener TNF-Synthese abhängig ist, kann durch IL-10 gehemmt werden (60). Darüberhinaus hat IL-10 autoregulatorische Wirkung, indem es in LPS-aktivierten Monozyten die IL-10-mRNA-Synthese hemmt (42). *In vivo* konnte gezeigt werden, daß Mäuse durch einmalige Gabe von IL-10 vor dem LPS-vermittelten Endotoxinschock geschützt sind (83). Bei der EAE wird IL-10 in späten Krankheitsstadien induziert. Ihm kommt somit eine eher immunsuppressive Wirkung zu, wodurch die Entzündung gebremst wird (99).

Leukemia Inhibitory Factor (LIF) in Konzentrationen von 1 -1000 U/ml. LIF ist ein Zytokin, dem als Rezeptor, ebenso wie IL-6, CNTF und Oncostatin M, das Glycoprotein gp 130 dient (58). Produktionsort sind Immunzellen, Thymuszellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Hepatozyten. Es hat multiple biologische Funktionen, wie die Induktion der Synthese von Akute-Phase-Proteinen (6), die Differenzierung von Myeloischen Leukämie-Zellen (134), die Hemmung der Differenzierung pluripotenter Stammzellen (185, 220) und die Förderung der neuronalen Differenzierung (139, 223). Induziert wird die LIF-Wirkung von IL-1 und TNF- α . Villinger et al. konnten zeigen, daß LIF die Zytokinexpression in Chondrozyten stimuliert (2010). Ähnliche Effekte konnten in Blutmonozyten, Synoviozyten, epithelialen und neuronalen Zelllinien nachgewiesen werden (210). LIF hat somit über die Expression von IL-1 β , IL-6, IL-8 Einfluß auf entzündliche und immunologische Prozesse. Bei der LPS-stimulierten Myelopoese übt LIF einen entgegengesetzten Einfluß wie TNF- α aus. LIF hemmt hierbei die Kolonieformation der Zellen in Anwesenheit von LPS und M-CSF und wirkt möglicherweise als negativer Regulator der Monozytopoese (108).

2.6.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind eine Gruppe von Polypeptiden, die die Zellproliferation nach Bindung an spezifische Glykoproteinrezeptoren auf der Zelloberfläche fördern. Sie werden lokal sezerniert und wirken auto-, para- oder intrakrin. Einige Wachstumsfaktorrezeptoren beinhalten eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Durch Bindung an ihn wird seine Autophosphorylierung und die Phosphorylierung intrazellulärer Substrate in Gang gesetzt. Andere Rezeptoren werden nach Interaktion mit dem Wachstumsfaktor internalisiert. Wachstumsfaktoren beeinflussen in der Zielzelle Protein-, DNA- und RNA-Synthese sowie die Zellteilung. Außerdem bewirken sie Änderungen im Glukosetransport, im Transport von Aminosäuren sowie im Ionenstrom.

Epidermal growth factor (EGF) wurde in Konzentrationen von 0,1- 1000 ng/ml

getestet. EGF fördert die Proliferation von Epithelien und epidermalen Zellen. Der EGF- Rezeptor stellt eine Tyrosinkinase dar (86); er kommt auf fast allen Säugetierzellen vor (26). An biologischen Wirkungen sind u. a. die Unterstützung der Wundheilung bei Ratten (176), die Stimulation der Korneaepithel-Regeneration bei Mäusen (203) und die Hemmung der gastralen Säureproduktion (144) bekannt. Außerdem scheint EGF den Hypothalamus- Hypophysen-Nebennieren-Regelkreis zu stimulieren (120). Maiese et al. konnten 1993 feststellen, daß EGF die Überlebensrate von Hippocampusneuronen nach anoxischer Schädigung, zum Teil durch Schutz vor der toxischen Wirkung von NO, erhöht (128).

Fibroblast growth factor (FGF) ebenfalls in Konzentrationen von 0,1-1000 ng/ml

getestet, kommt in zwei Formen vor: als saurer und als basischer Faktor. Das saure FGF (acidic) ist auch unter der Bezeichnung Endothelial Cell Growth Factor, Eye-derived Growth Factor II, Heparin Binding Growth Factor alpha, Astroglia Growth Factor I oder Prostatropin bekannt (215). Das basische (basic) FGF ist identisch mit Eye-derived Growth Factor I, Heparin Binding Growth Factor beta, Cartilage-derived Growth Factor und Chondrosarcoma-derived Growth Factor (117). Beide Formen wirken mitogen für mesodermal und neuroektodermal abstammende Zellen (61). Biologische Funktionen sind unter anderem die Angiogenese (162), die Förderung des Neuritenwachstums (138), Protektion fetaler Hippocampusneurone

(213) und die

Unterstützung der Wundheilung. Shimojo et al. konnten zeigen, daß bFGF von Rattenmikroglia produziert wird (182). Ishikawa et al. stellten fest, daß die aFGF-Konzentration im N. ischiadicus wesentlich höher ist, als im ZNS (91). Nach Traumatisierung des Nerven fiel die Konzentration im distalen Segment zunächst ab, um nach 10 Tagen wieder auf dem Ausgangsniveau zu sein. Daraus kann geschlossen werden, daß aFGF im Neuron produziert und anterograd transportiert wird. Eine protektive Wirkung von bFGF auf Hippocampusneurone nach zerebraler Ischämie über 3 Minuten konnte von Nakata et al. 1993 gezeigt werden (142). Auch Kumon et al. fanden 1993 nach experimenteller Ischämie durch einseitigen Verschuß der A. cerebri media im Rattengehirn einen Anstieg des bFGF in Astrozyten und Neuronen des ischämischen Bezirks (109). Auch dies weist auf eine protektive Wirkung des Wachstumsfaktors hin. Maiese et al. fanden 1993, daß bFGF ebenso wie EGF cortikale Neurone vor NO-Toxizität schützte (128). Goureau et al. schließlich beschrieben 1993 eine hemmende Wirkung der FGFs auf die NO-Synthase (NOS) in bovinen RPE-Zellen (retinale pigmentierte Epithelzellen) (63).

Insulin-like Growth Factor I/II (IGF I/ II) wurde in Konzentrationen von 0,1 -1000 ng/ml auf einen möglicherweise NOS-hemmenden Effekt untersucht. Die IGF zählen zu den Somatomedinen; die beiden Hauptvertreter sind IGF I und IGF II (36). IGF I ist ein basisches Polypeptid, es hat strukturelle Ähnlichkeit mit NGF, EGF und Proinsulin. Das saure IGF II stimmt in seiner Struktur zu über 60 % mit dem IGF I überein (160, 161). Im Blut zirkuliert IGF an Bindungsproteine gekoppelt, von denen mindestens drei verschiedene Klassen existieren (5, 80). Bindungsprotein 2 kommt in höherer Konzentration in Gehirn und Liquor vor. Seine Expression ist von der Sekretion des hypophysären Wachstumshormons abhängig. Für die IGF sind zwei verschiedene Rezeptoren bekannt: R 1 interagiert mit IGF I und bindet Insulin schwach (205). Er besitzt Tyrosinkinaseaktivität. R 2 interagiert mit IGF II und bindet Insulin nicht. Er besitzt keine Tyrosinkinaseaktivität. R 2 ist identisch mit dem Rezeptor für Mannose-6-Phosphat (125, 137). Der Typ 1-Rezeptor vermittelt die mitogene Antwort des IGF in einigen Zellen (101, 158). Biologische Wirkungen der IGF sind u. a. ein Mitwirken an der Zellproliferation (74,

200), und die Stimulation des Wachstums von Schwann-Zellen in Anwesenheit von Forskolin oder cAMP (177). McKillop et al. (1995) fanden eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate und einen gesteigerten renalen Plasmafluß durch IGF I in der isolierten Rattenniere. Diese Aktivierung ließ sich durch NAME (nichtselektiver NOS-Inhibitor) und Aminoguanidin (ein selektiver iNOS-Inhibitor) hemmen (131).

Nerve growth factor (NGF) in Konzentrationen von 0,1-1000 ng/ml getestet, gehört in die Familie der Neurotrophine. Als Rezeptor wurde eine Tyrosinproteinkinase entdeckt (77). Im ZNS ist die höchste Konzentration an NGF- mRNA im Hippocampus und im Cortex zu finden (181). In cholinergen Neuronen des Vorderhirns von Ratten konnten Bindungsstellen für radioaktiv markiertes NGF gefunden werden (56).

Der Transport des NGF erfolgt retrograd vom Nervenende zum Zellkörper (68, 78). Nach ZNS-Verletzungen konnte ein vorübergehender Anstieg an NGF im Liquor Erwachsener nachgewiesen werden (151). Jackson et al. konnten (1992) eine Protektion von Ratten-Phäochromozytomzellen unter H₂O₂-Stress durch NGF-Vorbehandlung feststellen (93). An weiteren biologischen Wirkungen sind vor allem die neurotrophe Wachstumsorientierung (durch Leitung der wachsenden Axone entlang des Konzentrationsgradienten) (16), die Förderung des Neuritenwachstums (48, 112), außerdem Einflüsse auf das Immunsystem, wie die Histaminausschüttung aus Mastzellen, bekannt (22). Rezeptoren wurden auch auf Thymozyten gefunden (9).

Pan und Perez-Polo (1993) konnten den Einfluß des NGF auf den Glutathion-Metabolismus in Ratten-Phäochromozytomzellen (PC12-Zellen) nachweisen (150). Behandlung mit NGF führt zu einer Stimulation der Glutathionperoxidase, der Glutathionreduktase, der Glukose-6Phosphat-Dehydrogenase und zum Anstieg der Glutathionkonzentration. Hierdurch wird der oxidative Streß durch freie Radikale verringert. Ein möglicher klinischer Einsatz des NGF wird bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen, wie z. B. M. Alzheimer, Amyotropher Lateralsklerose oder M. Parkinson untersucht.

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) wurde in Konzentrationen von 2 -2000 ng/ml eingesetzt. CNTF ist strukturell dem Interleukin 6, LIF, Oncostatin und

hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie z. B. GM-CSF verwandt (7, 89). Sein α -Rezeptor ähnelt sehr dem IL6- α -Rezeptor, wird jedoch fast ausschließlich in Nervensystem exprimiert, wo er auf Neuronen gefunden wurde (37, 88). Er ist mit dem Rezeptorkomplex assoziiert, der auch den LIF- β -Rezeptor und den Signaltransduktor gp130 enthält. Über diesen Rezeptor wird die zelluläre Antwort auf CNTF vermittelt: die überlebensverlängernde und phänotyptransformierende Wirkung auf Zellen *in vitro* (90, 127), die neuroprotektive Wirkung *in vivo* z. B. bei der Entwicklung von Motoneuronen in Küken (217) und v.a. die Motoneuron-erhaltende Funktion (179). Weitere Funktion ist u. a. die Förderung der Reifung von Oligodendrozyten und der Schutz vor ihrem apoptotischen Tod (119). Hagg et al. (1993) untersuchten die Wirkung von CNTF auf die Expression von LNGFR (low-affinity NGF-Rezeptor) *in vivo* bei Corpus callosum-Mikroglia von gesunden und verletzten ausgewachsenen Ratten, sowie *in vitro* bei Mikrogliaulturen von neugeborenen Ratten. Sie fanden hierbei sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Induktion morphologischer Veränderungen (Aktivierung der Mikroglia). Außerdem wurde die Expression von LNGFR und CD4 auf der Zelloberfläche durch CNTF stimuliert (67). Endogenes CNTF spielt somit wahrscheinlich eine Rolle bei Immunreaktionen des ZNS.

Oncostatin M wurde in Konzentrationen von 0,1 -100 ng/ml eingesetzt.

Oncostatin ist ein Glycoprotein, das strukturell und funktionell Ähnlichkeit zu LIF und CNTF besitzt. Im Gegensatz zu CNTF hat es keine Auswirkung auf das Überleben von Ciliarneuronen (157). Von T-Lymphozyten und Monozyten produziert (21), fungiert es als Wachstumsregulator, indem es das Wachstum humaner maligner Melanomzellen und anderer Carcinomzelllinien hemmt und das Wachstum bestimmter Fibroblastenkulturen fördert (82, 225). Weitere Wirkungen sind die Stimulation der Produktion von Akute- Phase- Proteinen (159), sowie in geringerem Maße ein Anstieg der Acetylcholintransferase-Aktivität und des vasoactive intestinal polypeptid (VIP)-Spiegels in Kulturen von sympathischen Neuronen von Ratten (157).

2.6.3 Neuropeptide und Peptidtransmitter

Aus der Gruppe der Neuropeptide/Peptidtransmitter untersuchten wir Bombesin, Neuropeptid Y, Peptid YY, Substanz P, Neuromedin N und Neurotensin. Diese Substanzen kommen im Zentralen und Peripheren Nervensystem sowie im autonomen Nervensystem vor. Sie haben Einfluß auf verschiedene Funktionen der Zielzelle.

Bombesin, ein Neuropeptid, welches in peptidergen Nervenbahnen der Tunica muscularis externa des Gastrointestinaltraktes vorkommt, wurde in Konzentrationen von 100 pM/l -1000 nM/l eingesetzt. Bombesin stimuliert als Vermittler zwischen nervalem und immunologischem System (12) die Natural-Killer (NK) Aktivität z. B. gegen Kolonkarzinom-Zellen (Caco-2) (207). Außerdem erhöht es die Chemotaxis-Kapazität sowie die Phagozytose-Funktion von Peritonealmakrophagen (39).

Neuropeptide Y (NPY), wie Peptide YY ein Regulatorprotein aus der pankreatischen Polypeptidfamilie (123), wurde in Konzentrationen von 0,001 -100 nM/l eingesetzt. Die Rolle des NPY als Regulator neuronaler Übertragung in ZNS und peripherem Nervensystem wurde von mehreren Gruppen beschrieben (41, 49, 198). Als chemischer Transmitter in ZNS und PNS wurde es von Heilig und Widerlöv (1990) und Danger et al. (1990) beschrieben (35, 73). Außerdem fungiert es als hypophysiotropes Neurohormon, indem es die Sekretion verschiedener Hormone reguliert (35). Des Weiteren wurde NPY in Nervenendigungen immunkompetenter Organe (z. B. Milz) gefunden (121, 164). An biologischen Funktionen sind die Zunahme des Gefäßwiderstandes über noradrenerge Neurone (123), die Regulation kardiovaskulärer Funktionen (122) und sein Einfluß auf den Wasserhaushalt und die Nahrungsaufnahme (Hunger und Sättigungsgefühl) bekannt (73).

De la Fuente et al. beschrieben 1993 einen allgemein stimulierenden Effekt von NPY und PYY auf die Funktion von Peritonealmakrophagen mit Anstieg der Adhärenz-, Chemotaxis- und Phagozytose-Kapazität (38). Jazin et al. (1993) zeigten, daß PYY-mRNA, ebenso wie mRNA für den NPY/PYY-Rezeptor, vorübergehend während der Rattenembryogenese in Spinalganglien exprimiert wird (94). Nach peripherer Axotomie wird in Spinalganglienzellen vermehrt NO-Synthase-mRNA exprimiert; ebenso steigt in einigen dieser Zellen die Expression von NPY, vasoaktivem intestinalen Polypeptid (VIP) und anderen Peptiden, die unter normalen Umständen

kaum exprimiert werden (209).

Peptide Y (PYY) wurde ebenfalls in Konzentrationen von 0,001 -100 nM/l getestet.

PYY wird in endokrinen Zellen des Jejunums produziert und hemmt die exokrine Pankreassekretion (66, 198). Außerdem reguliert es den Tonus glatter Muskulatur, die Darmmotilität (124) und die Nahrungsresorption (190). PYY-mRNA wird während der Embryogenese am 16. Tag in Spinalganglien von Ratten exprimiert (94). Es spielt so möglicherweise als Neuropeptid eine Rolle bei der Entwicklung sensibler Neurone.

Substance P (SP) ein Neuropeptid, das im zentralen, peripheren und Darm-

Nervensystem verschiedener Spezies vorkommt (92, 154), wurde in Konzentrationen von 1 -1000 nM/l eingesetzt.

SP kommt eine wichtige Rolle als Neurotransmitter in primären sensorischen Neuronen, die der Schmerzempfindung dienen, zu (149). Auch außerhalb des Nervensystems erfüllt SP verschiedene Funktionen, so u. a. die Aktivierung von Makrophagen (70). Diese Aktivierung erfolgt über einen rezeptorvermittelten Mechanismus. Die Stimulation von Makrophagen über von geschädigten Neuronen freigesetzte SP kann die entzündliche Antwort in Nervengewebe initiieren, unterhalten oder verstärken (71).

Smith et al. beschrieben 1992 einen Anstieg an SP in Spinalganglien, die sensible Fasern von an Arthritis erkrankten Gelenken bei Ratten bilden (186). SP scheint auch für die Entstehung und Unterhaltung der Adjuvans-Arthritis, einer experimentellen Autoimmunerkrankung der Gelenke, eine wesentliche Rolle zu spielen (52). Die Infusion von SP in erkrankte Gelenke verstärkt die Entzündung und Gelenkzerstörung (113). SP stimuliert des weiteren periphere Blutmonozyten zur Produktion von IL-1, IL-6, TNF- α (118) und induziert die T-Zellproliferation (152) und die Antikörperproduktion durch B-Zellen (76). Nach SP-Stimulation von eosinophilen Granulozyten im Blut von Atopikern konnte ein Anstieg der PAF (platelet-activating factor)- und Leukotrien B₄-induzierten Chemotaxis observiert werden (145). Auch auf Mikroglia-Zellen konnten Rezeptoren für SP gefunden werden, über die ein Anstieg der IL-1-Produktion in Anwesenheit von LPS erfolgt (130).

Neuromedin N und **Neurotensin** wurden in Konzentrationen von 1 -1000 nM/l eingesetzt. Beides sind strukturverwandte Peptide, die sowohl im Gehirn als auch im Darm als Regulator fungieren. Daß beide aus einer gemeinsamen Vorstufe hervorgehen, konnte 1987 von Dobner et al. gezeigt werden (44). Carraway und Leeman (1973) isolierten Neurotensin aus dem Hypothalamus (27). Biologische Wirkungen sind u. a. Hypotonie, Hyperglykämie, Hemmung der Magensäureproduktion und der Darmmotilität (Leeman und Carraway 1982), außerdem die Regulation der Funktion des Hypophysenvorderlappens (3). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der beiden Peptide kann auch Neuromedin N an Neurotensinrezeptoren binden, wobei es agonistisch wirkt und dabei analgetisch und Hypothermie-induzierend wirkt. Williams und Beitz konnten zeigen, daß bei chronischem Schmerz der Spiegel an Neurotensin mRNA im Mittelhirn erhöht ist (219). Neurotensin scheint also eine Rolle bei der Modulation von akuter oder chronischer Schmerzempfindung zu spielen.

2.6.4 Chemokine

Aus der Familie der Chemokine untersuchten wir Macrophage-Inhibitory-Protein- α , RANTES und das Makrophagen-Chemoattraktive Protein-1. Chemokine sind immunregulatorische kleine Proteine, die unter anderem von Leukozyten sezerniert werden (147).

Macrophage Inflammatory Protein- α (MIP-1 α) kam in Konzentrationen von 0,01 - 10 ng/ml zur Anwendung. Im wesentlichen wird es von Endotoxin-stimulierten Makrophagen produziert. Auf bestimmte Lymphozytenpopulationen wirkt es chemotaktisch: in niedrigen Konzentrationen (100 pg/ml) konnte eine Wirkung eher auf B-Zellen und zytotoxische T- Zellen gefunden werden, in höherer Konzentration (10 ng/ml) scheint es diese Zellen weniger anzulocken, sondern mehr auf CD 4⁺- Zellen chemotaktisch zu wirken (171). Wolpe et al. entdeckten MIP als endogenes Pyrogen, das von Prostaglandinen unabhängig wirkt (221). Außerdem scheint es eine entscheidende Rolle bei der Meningitisentstehung und -unterhaltung zu spielen, indem es die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht, eine Liquorleukozytose hervorruft und zur Entstehung des Hirnödems beiträgt (170).

RANTES (**R**egulated on Activation, **N**ormal **T**-cell **E**xpressed and **S**ecreted) und das **Monozyten chemoattraktive Protein-1** (MCP-1) wurden in Konzentrationen von 0,1 -100 μ g/ml eingesetzt. RANTES wurde 1990 von Schall et al. als selektives Chemoattractans für Gedächtnis-T Lymphozyten (Träger des Oberflächenantigens CD4 und UCHL1) und Blutmonozyten entdeckt (172). Es induziert die Histaminfreisetzung aus humanen basophilen Granulozyten (110). Ein gemeinsamer Rezeptor für RANTES und MIP-1 α wurde 1993 von Gao et al. beschrieben (57). Über diesen kommt es zu einem vorübergehenden Anstieg der Ca⁺⁺ Konzentration in polymorphkernigen Leukozyten. An denselben RANTES-Rezeptor bindet auch MCP-1. Seine Wirkungen sind die Induktion einer erhöhten Zellfunktion in eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. Dadurch kommt es zur Degranulation, zum "respiratory burst" und zur Freisetzung lysosomaler Enzyme (60).

2.6.5 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Tyrosinkinaseinhibitoren unterbinden die Phosphorylierung verschiedener Tyrosinkinasen intrazellulär bzw. auf der Zelloberfläche und unterbrechen dadurch die entsprechenden Stoffwechselwege. Aus dieser Substanzgruppe wurden Genistein, Tyrphostin, Lavendustin A und Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der zytokininduzierbaren NO-Synthase getestet.

Genistein (50 $\mu\text{M/l}$) ist ein selektiver Inhibitor Tyrosin-spezifischer Proteinkinasen (1).

Es hemmt außerdem die LPS- getriggerte Aktivierung von Mausmakrophagen zur Lyse von B16 Melanomzellen und die LPS-induzierte NOS-Aktivität in Maus-Makrophagen (45, 46). Feinstein et al. (1993) konnten darüberhinaus eine Supprimierung der Aktivität der iNOS in Astrozyten und C6- Gliomzellen durch Genistein feststellen (50). Auch die iNOS-mRNA nahm dosisabhängig ab. Bei Präinkubation (30 min.) war die Hemmung am stärksten. Zur Induktion der iNOS-Expression in Astrozyten scheint also Tyrosinkinaseaktivität erforderlich zu sein. Hingegen konnte keine Blockierung der NO-Donator-abhängigen cGMP-Produktion in Neuronen nachgewiesen werden (163). Die Kainat- und Kalium-abhängige cGMP-Produktion, die über NO vermittelt wird, kann jedoch von Genistein gehemmt werden.

Tyrphostin (50 $\mu\text{M/l}$) ist ebenfalls ein hochspezifischer Inhibitor von Tyrosinkinasen.

Es gilt als kompetitiver Hemmer von Substraten der Tyrosinkinasen. Auch Tyrphostin vermag die LPS- getriggerte Aktivierung von Mausmakrophagen zur Lyse von B16 Melanomzellen zu hemmen (45, 46) und die LPS-induzierbare NOS in Astrozyten und C6- Gliomzellen zu blockieren (51).

Lavendustin A (50 $\mu\text{M/l}$), aus *Streptomyces griseolavendus* isoliert, zeigte hingegen keine signifikante Reduktion der iNOS in Astrozyten und C6- Gliomzellen (51). Es hat eine sehr niedrige Potenz, die Proteinkinase C und Proteinkinase A zu hemmen, jedoch eine sehr hohe zur Hemmung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase (84, 146). Rodriguez et al. fanden eine Hemmbarkeit der Kainat- und Kalium- abhängigen cGMP-Produktion, die über NO vermittelt wird, aber keine Blockierung der NO-Donor-abhängigen cGMP-Produktion in Neuronen (163).

Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat (MDHC), ein stabileres Analogon von Erbstatin, wurde in Konzentrationen von 0,5 -50 $\mu\text{M/l}$ eingesetzt. Umezawa et al. synthetisierten MDHC 1990 als viermal stabileren Inhibitor der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase als Erbstatin (206). MDHC hemmt außerdem die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors und verzögert die durch EGF induzierte S-Phase in ruhenden Rattennierenzellen. Eine weitere Wirkung des MDHC, die Induktion der Apoptose von kultivierten Thymozyten, wurde 1993 von Azuma et al. gezeigt (4). Seine Wirkung auf die NO-Synthase wurde bislang noch nicht untersucht.

2.7 Vitalitätstest

Dieser wurde durchgeführt, um zu ermitteln, ob eine verringerte NO-Konzentration nach Zugabe der Testsubstanz Folge einer erhöhten Zytotoxizität und somit nicht auf Hemmung der iNOS zurückzuführen ist. Hierzu wurde der Farbausschlußtest mit Trypanblau verwendet (97). Nach Abschluß der Experimente (72 Stunden) wurde jeweils pro Vertiefung 5µl Trypanblau auf die am Boden verbliebenen Zellen gegeben und der Anteil der blau gefärbten Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Abgestorbene Zellen sind nicht mehr in der Lage, den Farbstoff aus dem Zellkern zu entfernen und verbleiben daher als blaue Zellen, während die lebenden Zellen transparent erscheinen.

2.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der Hemmung der Nitritsekretion durch J774A.1-Zellen bzw. durch Mikroglia nach Inkubation mit verschiedenen MDHC-Konzentrationen wurde für jede Stimulator-MDHC(0-100 μ M)-Kombination die Einweg-Varianzanalyse (ANOVA=Analysis of Variances) mit zusätzlichem Scheffé-Test durchgeführt (166). Die Einweg-Varianzanalyse dient dem Vergleich mehrerer normalverteilter Mittelwerte. Hierbei wird geprüft, ob mehrere Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. In dieser Arbeit wurde grundsätzlich die Unterschiedlichkeit der Nitrit-Mittelwerte bei verschiedenen MDHC-Konzentrationen nachgewiesen. Nachdem die einfache Varianzanalyse zu einem statistisch signifikanten Befund geführt hatte, wurden multiple Vergleiche der einzelnen Stichproben untereinander angeschlossen. Hierbei kam der Scheffé-Test zur Anwendung. Es konnte hiermit im Speziellen nachgewiesen werden, ab welcher Inhibitor-Konzentration eine signifikante Hemmung erfolgte. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Tabelle 2: Substanzen

Name	Abkürzung	Quelle	Hersteller	Stocklösung	Konzentrationen
Zytokine					
Interleukin 6	IL-6	human rekombinant	Intergen;Purchase, USA	2µg/ml	100-10-1-0, 1ng/ml
Interleukin 10	IL-10	human rekombinant	Genzyme;Cambridge	2µg/ml	100-10-1-0, 1ng/ml
Leukemia inhibiting factor	LIF	human rekombinant	Gibco, Eggenstein	10 5 U/ml	1000-100-10-1 U/ml
Wachstumsfaktoren					
Endothelial growth factor	EGF	Maus	Biomol; Hamburg	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
Acidic fibroblast growth factor	a-FGF	human rekombinant	Intergen;Purchase, USA	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
Basic fibroblast growth factor	b-FGF	human rekombinant	Intergen;Purchase, USA	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
Insulin-like growth factor I	IGF-I	human rekombinant	Intergen;Purchase, USA	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
Insulin-like growth factor II	IGF-II	human rekombinant	Intergen;Purchase, USA	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
7S Nerve growth factor	7S-NGF	Maus	Biomol; Hamburg	20µg/ml	1000-100-10-1-0, 1 ng/ml
Ciliary neurotrophic factor	CNTF	human rekombinant	Regeneron Pharm., Inc. Tarrytown, NY; USA	40 µg/ml	2000-200-20-2 ng/ml
Oncostatin M		human	Serva, Heidelberg	2µg/ml	100-10-1-0, 1 ng/ml
Neuropeptide/Peptidtransmitter					
Bombesin			Sigma; Deisenhofen	20 µM	1000-100-10nM-1000-100pM
Neuromedin N		Schwein synthetisch	Sigma; Deisenhofen	2µM	100-10-1-0, 1 nM
Neurotensin			Sigma; Deisenhofen	20µM	1000-100-10-1 nM
Substance P			Sigma; Deisenhofen	20µM	1000-100-10-1 nM
Neuropeptide Y	NPY		Sigma; Deisenhofen	2µM	100-10-1-0, 1-0,01-0,001nM
Peptide YY	PYY	human synthetisch	Sigma; Deisenhofen	2µM	100-10-1-0, 1-0,01-0,001mM

Name	Abkürzung	Quelle	Hersteller	Stocklösung	Konzentrationen
Chemokine					
Macrophage inflammatory protein 1 α	MIP-1 α	human rekombinant	Serva, Heidelberg	200ng/ml	10-1-0, 1-0, 0, 0, 1ng/ml
Monocyte chemoattractant protein 1	MCP-1	human rekombinant	Biomol, Hamburg	2 μ g/ml	100-10-1-0, 1ng/ml
RANTES		human rekombinant	Gibco, Eggenstein	2 μ g/ml	100-10-1-0, 1ng/ml
Tyrosinkinase-Inhibitoren					
Genistein			Gibco, Eggenstein	1000 μ M	50 μ M
Tyrphostin			Gibco, Eggenstein	1000 μ M	50 μ M
Lavendustin A			Gibco, Eggenstein	1000 μ M	50 μ M
Methyl-2,5-dihydroxycinnamat	MDHC		Gibco, Eggenstein	1000 μ M	50-40-30-25-20-10-5-2-1-0,5 μ M

3. Ergebnisse

3.1 Nitritproduktion von J774A.1, Mikroglia, Peritonealmakrophagen und Astrozyten nach Stimulation mit LPS und/oder γ -IFN.

In der vorliegenden Arbeit wurden LPS in einer Konzentration von 1 μ g/ml und γ -IFN in einer Konzentration von 100 U/ml eingesetzt. Hierdurch kam es zu einem Anstieg der Nitrit-Konzentration von 1 ± 1 μ mol/l bei unstimulierten Kontrollen auf 25-35 μ mol/l je nach Zellart. Dieser Anstieg der Nitritkonzentration war durch NMMA hemmbar (Tab. 3).

Tabelle 3: Nitritkonzentrationen in den Zellkulturüberständen von J774A.1, Peritonealmakrophagen, Astrozyten und Mikroglia ohne Stimulator, nach Zugabe von LPS (1 μ g/ml), γ -IFN (100 U/ml) und nach Hemmung mit NMMA (100 μ M)

	unstim.	LPS	γ -IFN	LPS+ γ -IFN	LPS+ NMMA	γ -IFN+ NMMA	LPS+ γ -IFN +NMMA
J774A. 1	1 \pm 1	36 \pm 8	39 \pm 6	nicht getestet	17 \pm 6	19 \pm 6	nicht getestet
Peritoneal- makrophagen	6 \pm 2	32 \pm 6	28 \pm 4	nicht getestet	9 \pm 3	8 \pm 3	nicht getestet
Mikroglia	2 \pm 1	nicht ge- testet	nicht ge- testet	32 \pm 11	nicht getestet	nicht getestet	5 \pm 2
Astrozyten	2 \pm 1	nicht ge- testet	nicht ge- testet	33 \pm 8	nicht getestet	nicht getestet	4 \pm 1

Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 132-216 Messungen in 18 (Mikroglia) bis 39 (J774A.1) separaten Versuchen.

3.2 Einfluß verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Chemokine und Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die NO-Produktion

Für die meisten der getesteten Substanzen konnte keine Hemmung der iNOS nachgewiesen werden (Tabellen 3-5). Die gemessene Nitritkonzentration unterschied sich nach Stimulation mit LPS und/oder γ -IFN nicht von der nach Zusatz von Interleukin-6 (0,1-100 ng/ml), Interleukin-10 (0,1-100 ng/ml), LIF (1-1000 U/ml), EGF (0,1-1000 ng/ml), saurem und basischem FGF (0,1-1000 ng/ml), IGF-1 und 2 (0,1-1000 ng/ml), 7S NGF (0,1-1000 ng/ml), CNTF (2-2000 ng/ml), Oncostatin M (0,1-100 ng/ml), Bombesin (100 pM/1-1000 nM/l), Neuromedin N (0,1-100 nM/l), Neurotensin (1-1000 nM/l), Substanz P (1-1000 nM/l), Neuropeptid Y (0,001-100 nM/l), Peptid YY (0,001-100 nM/l), MIP-1 α (0,01-10 ng/ml), MCP-1 (0,1-100 ng/ml), RANTES (0,1-100 ng/ml), Genistein (50 μ M), Tyrphostin (50 μ M), und Lavendustin A (50 μ M). Diese Ergebnisse waren bei allen untersuchten Zellarten (Mikroglia, Peritonealmakrophagen und J774) identisch. Keine der getesteten Substanzen hatte in Abwesenheit von LPS und γ -IFN einen iNOS-stimulierenden Effekt (Tabellen 4-6).

Tabelle 4: Einfluß von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden und Chemokinen auf die NO-Synthaseaktivität gemessen als Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von J774A.1-Zellen nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN
 Angegeben ist jeweils die Nitritkonzentration in $\mu\text{M/l}$ (Mittelwerte und Standardabweichung)

Testsubstanz	Konzentration	LPS allein	LPS + Testsubstanz	LPS+ NMMA	γ -IFN allein	γ -IFN + Testsubstanz	γ -IFN+ NMMA	unstimuliert
Zytokine								
IL-6	100 ng/ml	46 \pm 5	45 \pm 4	20 \pm 5	38 \pm 4	37 \pm 3	22 \pm 5	2 \pm 0
IL-10	100 ng/ml	54 \pm 10	51 \pm 11	28 \pm 9	47 \pm 10	46 \pm 12	32 \pm 10	3 \pm 1
LIF	1000 U/ml	44 \pm 2	42 \pm 4	20 \pm 4	39 \pm 4	37 \pm 5	24 \pm 6	2 \pm 1
Wachstumsfaktoren								
EGF	1000 ng/ml	59 \pm 11	61 \pm 5	31 \pm 8	45 \pm 11	47 \pm 4	31 \pm 7	2 \pm 0
aFGF	1000 ng/ml	59 \pm 11	60 \pm 6	31 \pm 8	45 \pm 11	46 \pm 8	31 \pm 7	2 \pm 0
bFGF	1000 ng/ml	59 \pm 11	56 \pm 11	31 \pm 8	45 \pm 11	40 \pm 6	31 \pm 7	2 \pm 0
IGF-1	1000 ng/ml	67 \pm 15	57 \pm 10	34 \pm 12	52 \pm 8	48 \pm 7	32 \pm 9	4 \pm 2
IGF-2	1000 ng/ml	64 \pm 12	63 \pm 11	34 \pm 12	52 \pm 8	48 \pm 4	32 \pm 9	4 \pm 2
7S-NGF	1000 ng/ml	67 \pm 15	66 \pm 12	34 \pm 12	52 \pm 8	48 \pm 4	32 \pm 9	4 \pm 2
CNTF	2000 ng/ml	10 \pm 4	10 \pm 3	3 \pm 1	19 \pm 3	21 \pm 5	8 \pm 1	1 \pm 1
Oncostatin M	100 ng/ml	27 \pm 3	29 \pm 5	12 \pm 1	33 \pm 3	31 \pm 3	15 \pm 4	1 \pm 0
Neuropeptide								
Bombesin	1000 nM/l	48 \pm 7	47 \pm 6	27 \pm 12	44 \pm 7	42 \pm 5	33 \pm 8	2 \pm 1
NPY	100 nM/l	48 \pm 7	48 \pm 6	27 \pm 12	44 \pm 7	45 \pm 6	33 \pm 8	2 \pm 1
PYY	100 nM/l	48 \pm 7	50 \pm 6	27 \pm 12	44 \pm 7	42 \pm 6	33 \pm 8	2 \pm 1
Substance P	1000 nM/l	27 \pm 3	26 \pm 3	12 \pm 1	33 \pm 3	30 \pm 2	15 \pm 4	1 \pm 0
Neuromedin N	100 nM/l	27 \pm 3	26 \pm 4	12 \pm 1	33 \pm 3	31 \pm 4	15 \pm 4	1 \pm 0
Neurotensin	1000 nM/l	24 \pm 10	25 \pm 10	9 \pm 4	30 \pm 9	30 \pm 10	18 \pm 5	1 \pm 0
Chemokine								
MIP-1 α	10 ng/ml	24 \pm 10	23 \pm 9	9 \pm 4	30 \pm 9	28 \pm 9	18 \pm 5	1 \pm 0
MCP-1	100 ng/ml	10 \pm 4	9 \pm 3	3 \pm 1	19 \pm 3	15 \pm 2	8 \pm 1	1 \pm 1
RANTES	100 ng/ml	44 \pm 2	40 \pm 6	20 \pm 4	39 \pm 4	35 \pm 6	24 \pm 6	2 \pm 1

Tabelle 5: Einfluß von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Neuropeptiden auf die NO-Synthaseaktivität gemessen als Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN
 Angegeben ist jeweils die Nitritkonzentration in $\mu\text{M/l}$ (Mittelwerte und Standardabweichung)

Testsubstanzen	Konzentration	LPS allein	LPS + Testsubstanzen	LPS+ NMMA	γ -IFN allein	γ -IFN+ Testsubstanzen	γ -IFN+ NMMA	unstimuliert
Zytokine								
IL-6	100 ng/ml	32±3	28±1	9±2	27±2	26±3	8±2	8±3
IL-10	100 ng/ml	32±3	28±0	9±2	27±2	27±3	8±2	8±3
LIF	1000 U/ml	32±3	31±5	9±2	27±2	28±4	8±2	8±3
Wachstumsfaktoren								
EGF	1000 ng/ml	38±7	37±6	11±5	31±9	31±9	12±6	7±3
aFGF	1000 ng/ml	38±7	37±5	11±5	31±9	31±10	12±6	7±3
bFGF	1000 ng/ml	38±7	37±7	11±5	31±9	30±9	12±6	6±3
IGF-1	1000 ng/ml	33±5	29±3	9±2	29±5	31±2	9±2	9±2
IGF-2	1000 ng/ml	33±5	31±5	9±2	29±5	32±4	9±2	9±2
7S-NGF	1000 ng/ml	33±3	29±5	9±2	29±5	30±3	9±2	9±2
CNTF	2000 ng/ml	29±15	26±12	4±3	24±6	22±7	4±1	2±0
Oncostatin M	100 ng/ml	28±7	27±9	5±1	25±5	24±4	4±1	4±4
Neuropeptide								
Bombesin	1000 nM/l	34±3	32±1	15±4	31±1	29±2	14±4	6±2
NPY	100 nM/l	34±3	34±1	15±4	31±1	32±2	14±4	6±2
PYY	100 nM/l	34±3	35±3	15±4	31±1	31±3	14±4	6±2
Substance P	1000 nM/l	28±7	26±8	5±1	27±6	25±5	4±1	4±4
Neuromedin N	100 nM/l	28±7	27±8	5±1	25±5	24±6	4±1	4±4
Neurotensin	1000 nM/l	27±5	29±6	6±3	25±2	25±2	6±2	3±2
Chemokine								
MIP-1 α	10 ng/ml	27±5	25±4	6±3	25±2	24±2	6±2	3±2
MCP-1	100 ng/ml	29±15	24±15	4±3	24±6	21±6	4±1	2±0
RANTES	100 ng/ml	32±3	28±1	9±2	27±2	25±2	8±2	8±3

Tabelle 6: Einfluß von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden und Chemokinen auf die NO-Syntheseaktivität gemessen als Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von Rattenmikrogliazellen nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN. Wegen Zellmangels wurde jeweils nur die nach der Literatur wahrscheinlich am besten wirksame Konzentration untersucht. Angegeben ist jeweils die Nitritkonzentration in μ M/l (Mittelwerte und Standardabweichung).

Testsubstanzen	Konzentration	LPS+ γ -IFN	LPS+ γ -IFN+ Testsubstanz	LPS+ γ -IFN+ NMMA	un- stimuliert
Zytokine					
IL-6	2 ng/ml	32 \pm 11	25 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
IL-10	1 ng/ml	32 \pm 11	25 \pm 0	5 \pm 2	2 \pm 1
LIF	10 U/ml	32 \pm 11	25 \pm 0	5 \pm 2	2 \pm 1
Wachstums- faktoren					
EGF	10 ng/ml	32 \pm 11	26 \pm 0	5 \pm 2	2 \pm 1
aFGF	10 ng/ml	32 \pm 11	25 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
bFGF	10 ng/ml	32 \pm 11	31 \pm 3	5 \pm 2	2 \pm 1
IGF-1	20 ng/ml	32 \pm 11	26 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
IGF-2	20 ng/ml	32 \pm 11	25 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
7S-NGF	100 ng/ml	32 \pm 11	28 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
Oncostatin M	100 ng/ml	32 \pm 11	25 \pm 2	5 \pm 2	2 \pm 1
Neuropeptide					
Bombesin	100 pM/l	32 \pm 11	31 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
NPY	10 pM/l	32 \pm 11	45 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
PYY	10 pM/l	32 \pm 11	47 \pm 6	5 \pm 2	2 \pm 1
Substance P	100 nM/l	32 \pm 11	25 \pm 2	5 \pm 2	2 \pm 1
Neuromedin N	10 nM/l	32 \pm 11	24 \pm 0	5 \pm 2	2 \pm 1
Neurotensin	10 nM/l	32 \pm 11	24 \pm 1	5 \pm 2	2 \pm 1
Chemokine					
MIP-1 α	1 ng/ml	32 \pm 11	42 \pm 8	5 \pm 2	2 \pm 1
RANTES	100 ng/ml	32 \pm 11	24 \pm 3	5 \pm 2	2 \pm 1

Tabelle 7: Einfluß von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden und Chemokinen auf die NO-Syntheseaktivität gemessen als Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand von Rattenastrozyten nach Stimulation mit LPS oder γ -IFN. Wegen Zellmangels wurde jeweils nur die nach der Literatur wahrscheinlich am besten wirksame Konzentration untersucht.

Angegeben ist jeweils die Nitritkonzentration in μ M/l (Mittelwerte und Standardabweichung).

Testsubstanzen	Konzentration	LPS+ γ -IFN	LPS+ γ -IFN+ Testsubstanz	LPS+ γ -IFN+ NMMA	un- stimuliert
Zytokine					
IL-6	2 ng/ml	33 \pm 8	26 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
IL-10	1 ng/ml	33 \pm 8	25 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
LIF	10 U/ml	33 \pm 8	41 \pm 8	4 \pm 1	2 \pm 1
Wachstums- faktoren					
EGF	10 ng/ml	33 \pm 8	26 \pm 8	4 \pm 1	2 \pm 1
aFGF	10 ng/ml	33 \pm 8	30 \pm 10	4 \pm 1	2 \pm 1
bFGF	10 ng/ml	33 \pm 8	34 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
IGF-1	20 ng/ml	33 \pm 8	26 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
IGF-2	20 ng/ml	33 \pm 8	29 \pm 10	4 \pm 1	2 \pm 1
7S-NGF	100 ng/ml	33 \pm 8	24 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
Oncostatin M	100 ng/ml	33 \pm 8	25 \pm 9	4 \pm 1	2 \pm 1
Neuropeptide					
Bombesin	100 pM/l	33 \pm 8	33 \pm 2	4 \pm 1	2 \pm 1
NPY	10 pM/l	33 \pm 8	32 \pm 2	4 \pm 1	2 \pm 1
PYY	10 pM/l	33 \pm 8	33 \pm 2	4 \pm 1	2 \pm 1
Substance P	100 nM/l	33 \pm 8	25 \pm 10	4 \pm 1	2 \pm 1
Neuromedin N	10 nM/l	33 \pm 8	25 \pm 10	4 \pm 1	2 \pm 1
Neurotensin	10 nM/l	33 \pm 8	26 \pm 10	4 \pm 1	2 \pm 1
Chemokine					
MIP-1 α	1 ng/ml	33 \pm 8	36 \pm 4	4 \pm 1	2 \pm 1
RANTES	100 ng/ml	33 \pm 8	34 \pm 0	4 \pm 1	2 \pm 1

3.3 Hemmung der Zytokin-induzierbaren Nitrit-Produktion nach Inkubation mit Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat

Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat (MDHC), ein Tyrosinkinasehemmer, supprimierte die Aktivierung der NO-Synthase durch LPS und γ -IFN in J774A.1 Zellen (Abb. 4 - 6) und in Mikrogliaulturen (Abb. 7) *in vitro*. Halbmaximale Hemmung wurde bei Konzentrationen von ca. 20 μ M erreicht. In Konzentrationen über 40 μ M war ein dosisabhängiger zytotoxischer Effekt des MDHC festzustellen (Tab. 8 und 9). Bei niedrigeren MDHC-Konzentrationen, in denen eine signifikante Hemmung der Nitrit-Produktion zu verzeichnen war, war MDHC nicht toxisch (Trypan-Blau-Vitalitätstest)(Tab. 8 und 9). Hier lag der Anteil an abgestorbenen Zellen bei 3-25 %. Auch das als Lösungsmittel verwendete DMSO (Dimethylsulfoxid) hatte keinen hemmenden Effekt auf die iNOS (Abb. 3 und Abb. 8) und, in der verwendeten Konzentration, keine zytotoxische Wirkung. Präinkubation der Mikrogliazellen und der J774A.1-Zellen mit MDHC 24 Stunden vor Zugabe von LPS und γ -IFN zeigte keinen verbesserten Abfall der NO-Produktion (ohne Abb.). Alle anderen getesteten Tyrosinkinaseinhibitoren (Genistein, Tyrphostin und Lavendustin A) zeigten in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt auf die Induktion der NO-Synthase durch γ -IFN und LPS in Mikroglia und Astrozyten (Abb. 3 und 8). MDHC hemmte die γ -IFN- / LPS-induzierte NO-Produktion in Astrozyten nicht (Abb. 8).

Tabelle 8: Zelltod (J774.A 1 Zellen in %) nach Inkubation mit MDHC in verschiedenen Konzentrationen.

	MDHC	MDHC+γ-IFN	MDHC+LPS	MDHC+γ-IFN+LPS
100 μM	80 \pm 3	92 \pm 2	94 \pm 4	94 \pm 2
50 μM	65 \pm 5	85 \pm 6	76 \pm 12	90 \pm 2
40 μM	40 \pm 1	63 \pm 16	41 \pm 16	67 \pm 20
30 μM	23 \pm 3	29 \pm 10	28 \pm 12	36 \pm 16
25 μM	21 \pm 2	21 \pm 5	22 \pm 11	34 \pm 9
20 μM	8 \pm 2	15 \pm 6	8 \pm 2	16 \pm 7
10 μM	6 \pm 1	11 \pm 4	8 \pm 2	10 \pm 2
5 μM	9 \pm 2	9 \pm 4	9 \pm 3	9 \pm 1
2 M	10 \pm 2	6 \pm 2	7 \pm 2	9 \pm 3
1 μM	6 \pm 1	6 \pm 2	5 \pm 2	9 \pm 4
0,5 μM	7 \pm 2	10 \pm 1	6 \pm 2	10 \pm 5

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3-9 Messungen in 3 separaten Versuchen. Der Anteil abgestorbener Zellen ohne Zugabe von MDHC, sowie bei unstimulierten Zellen lag bei 5 - 20 %.

Tabelle 9: Zelltod (Mikrogliazellen in %) nach Inkubation mit MDHC in verschiedenen Konzentrationen.

	MDHC	MDHC+ γ-IFN+ LPS
50 μM	69 \pm 15	79 \pm 9
25 μM	32 \pm 5	30 \pm 4
20 μM	25 \pm 3	21 \pm 3
10 μM	18 \pm 4	20 \pm 4
5 μM	20 \pm 3	18 \pm 2
2 μM	19 \pm 2	19 \pm 5
1 μM	18 \pm 5	21 \pm 3
0,5 μM	18 \pm 4	20 \pm 4

Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 2-6 Messungen in 3 separaten Versuchen. Der Anteil abgestorbener Zellen ohne Zugabe von MDHC, sowie bei unstimulierten Zellen lag bei 5 - 30 %.

Abb. 3: Einfluß der Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein, Tyrphostin, Lavendustin A und Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat (MDHC), sowie des Lösungsmittels DMSO auf die NO-Synthase mit und ohne Stimulation mit γ -IFN und LPS in Mikroglia-Kulturen neugeborener Lewis-Ratten

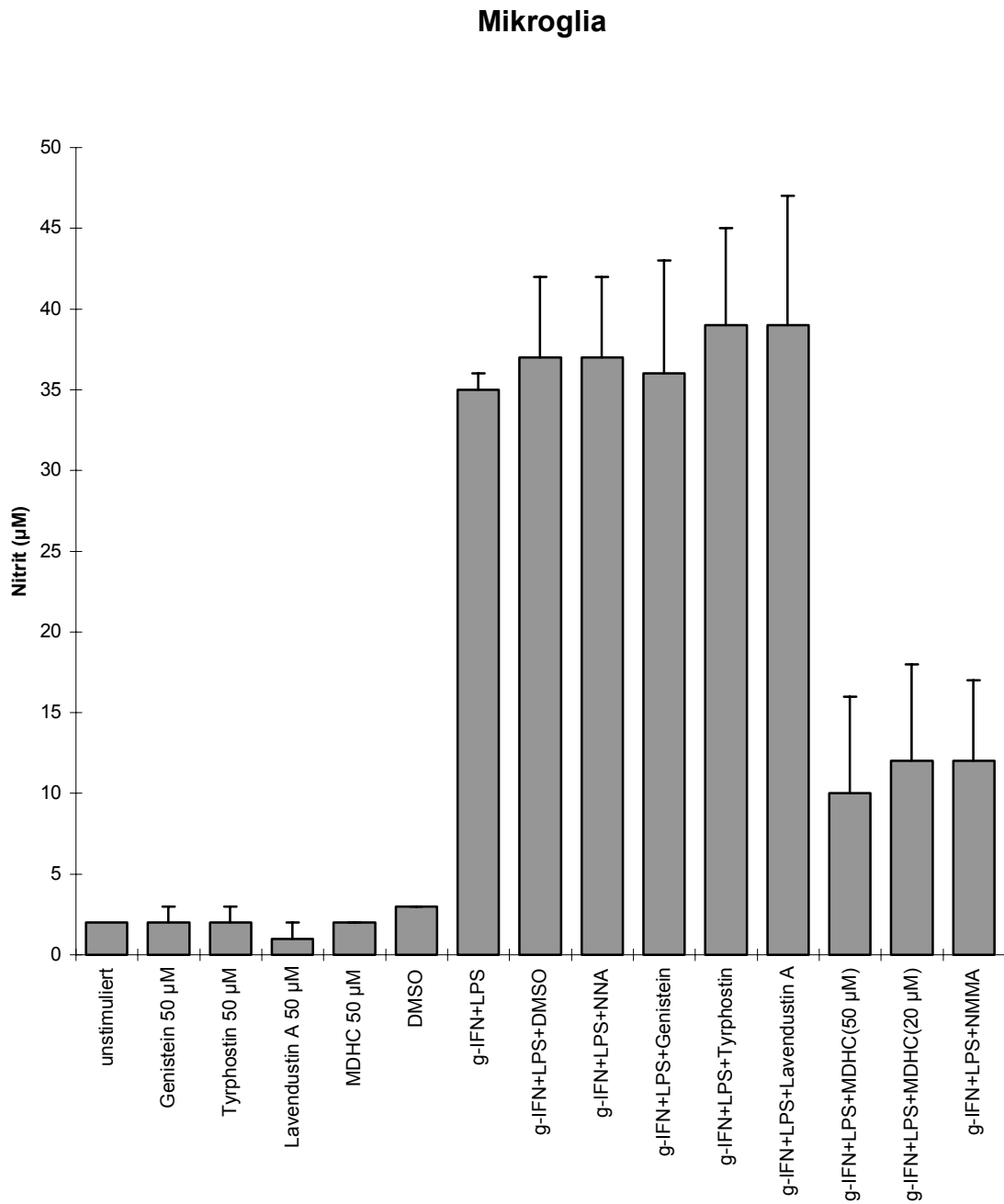
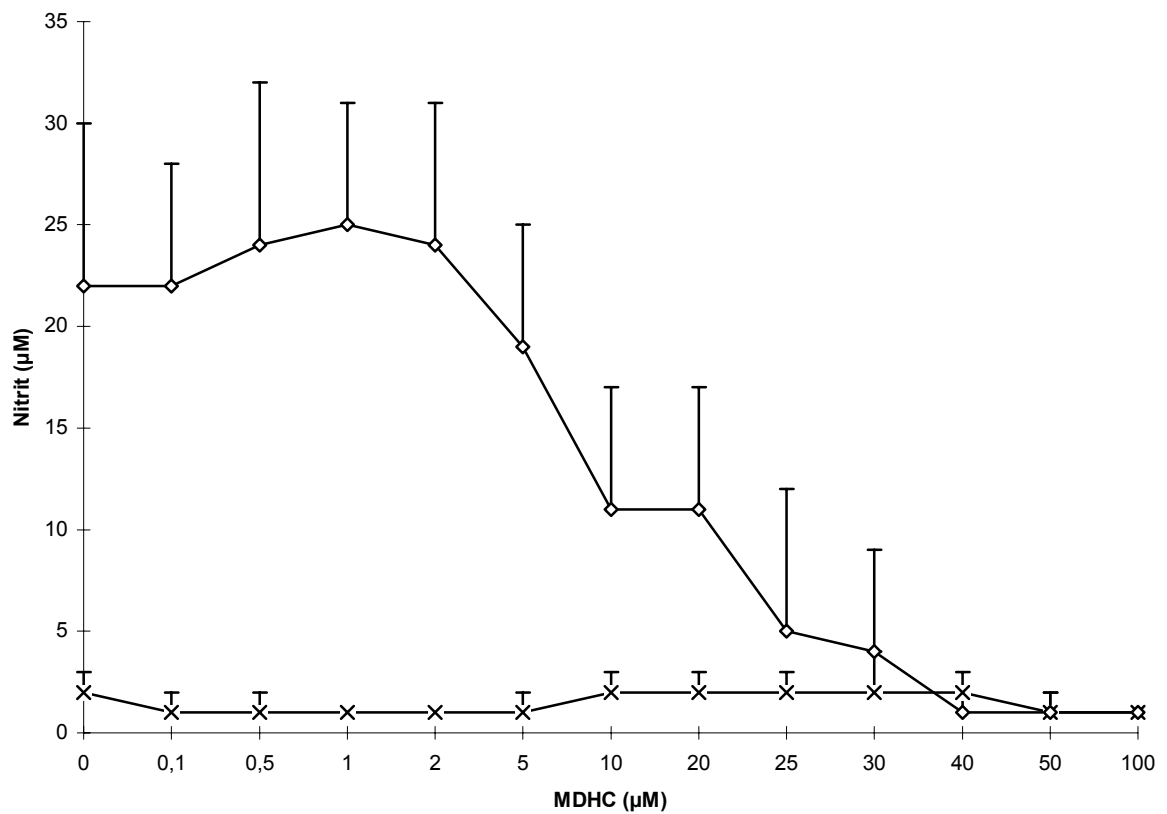


Abb. 4: Hemmung der Nitritsekretion der Mausemakrophagenzelllinie J774A.1 durch steigende Konzentration von MDHC (0,1-100 $\mu\text{M/l}$) ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/l}$ nach Induktion der NO-Synthase mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS über 3 Tage.

J774A.1



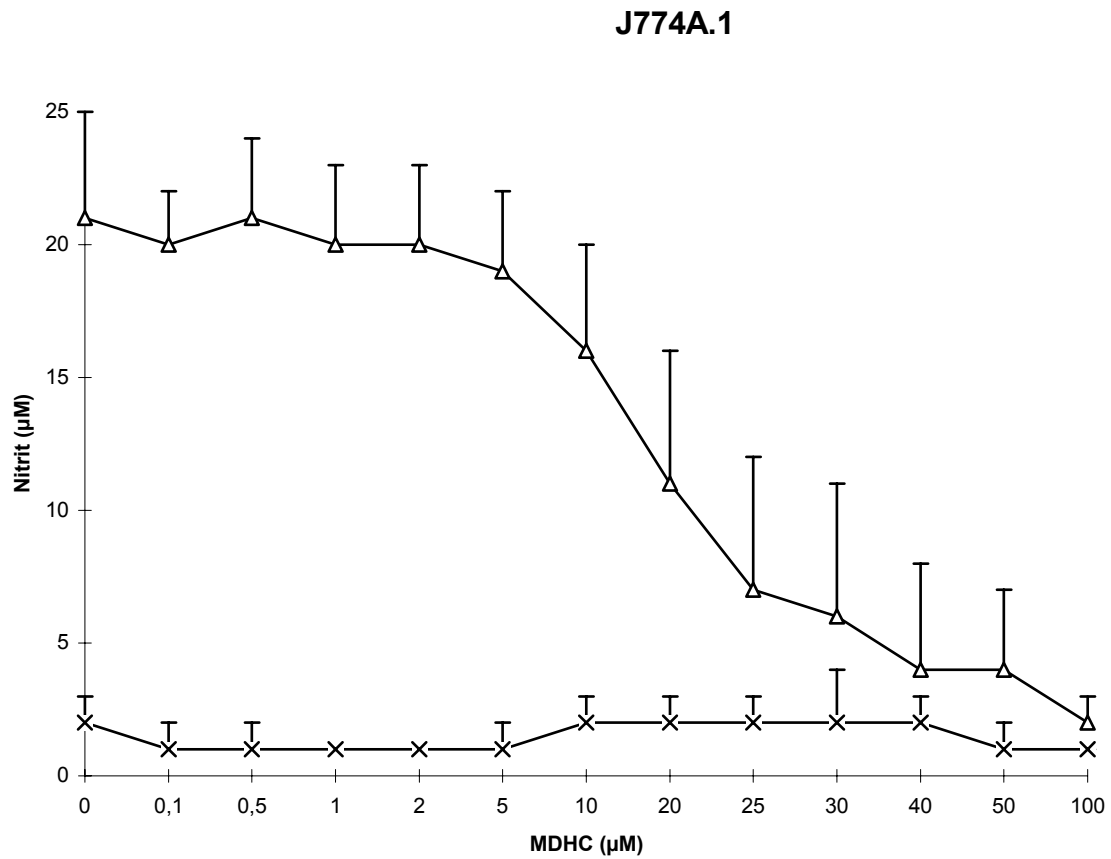
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 15 -24 Messungen in 5-8 separaten Versuchen.

-x- = Inkubation mit MDHC

-◇- = Inkubation mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) und MDHC

Signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/l}$ MDHC ($p < 0,02$)

Abb. 5: Hemmung der Nitritsekretion der Mausemakrophagenzelllinie J774A.1 durch steigende Konzentration von MDHC (0,1-100 $\mu\text{M/l}$) ab einer Konzentration von 20 $\mu\text{M/l}$ nach Induktion der NO-Synthase mit 100 U/ml $\gamma\text{-IFN}$ über 3 Tage.



Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 15 -24 Messungen in 5-8 separaten Versuchen.

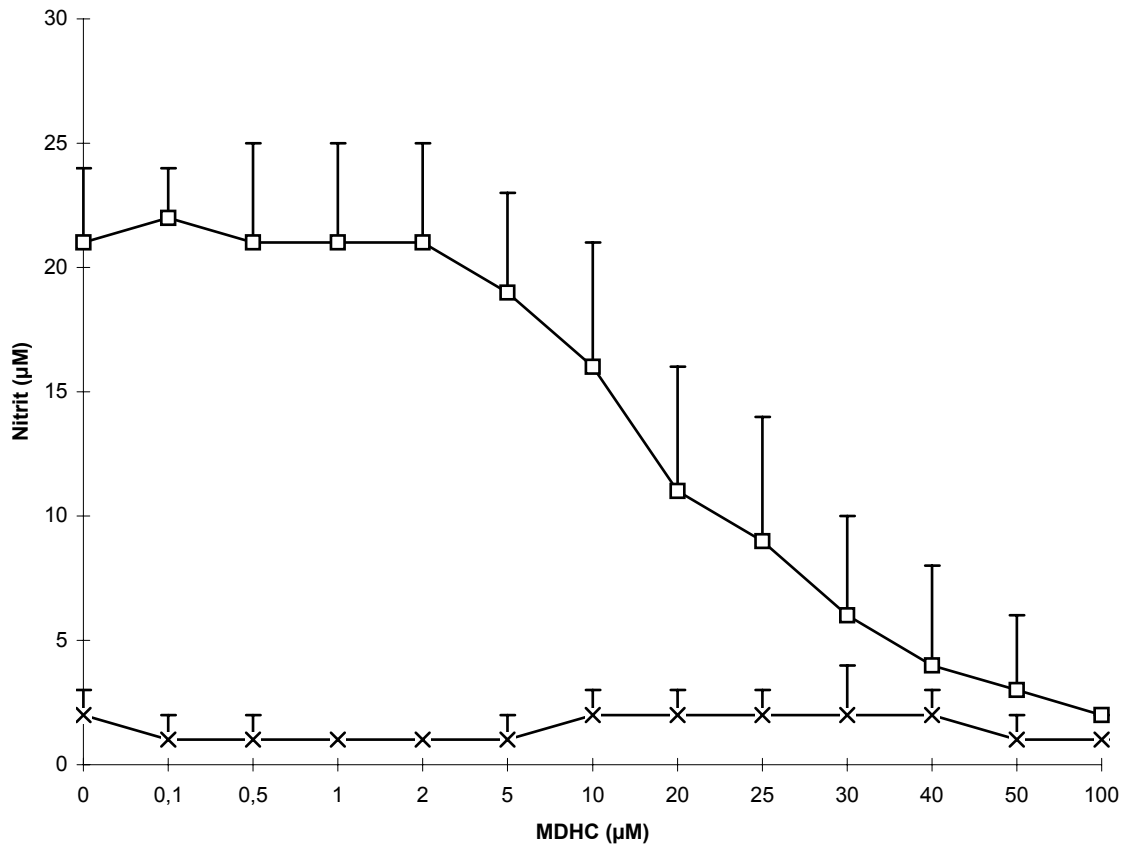
-x- = Inkubation mit MDHC

Δ = Inkubation mit $\gamma\text{-IFN}$ (100 U/ml) und MDHC

Signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 20 $\mu\text{M/l}$ MDHC ($p < 0,001$)

Abb. 6: Hemmung der Nitritsekretion der Mausmakrophagenzelllinie J774A.1 durch steigende Konzentration von MDHC (0,1-100 $\mu\text{M/l}$) ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/l}$ nach Induktion der NO-Synthase mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 100 U/ml $\gamma\text{-IFN}$ über 3 Tage.

J774A.1



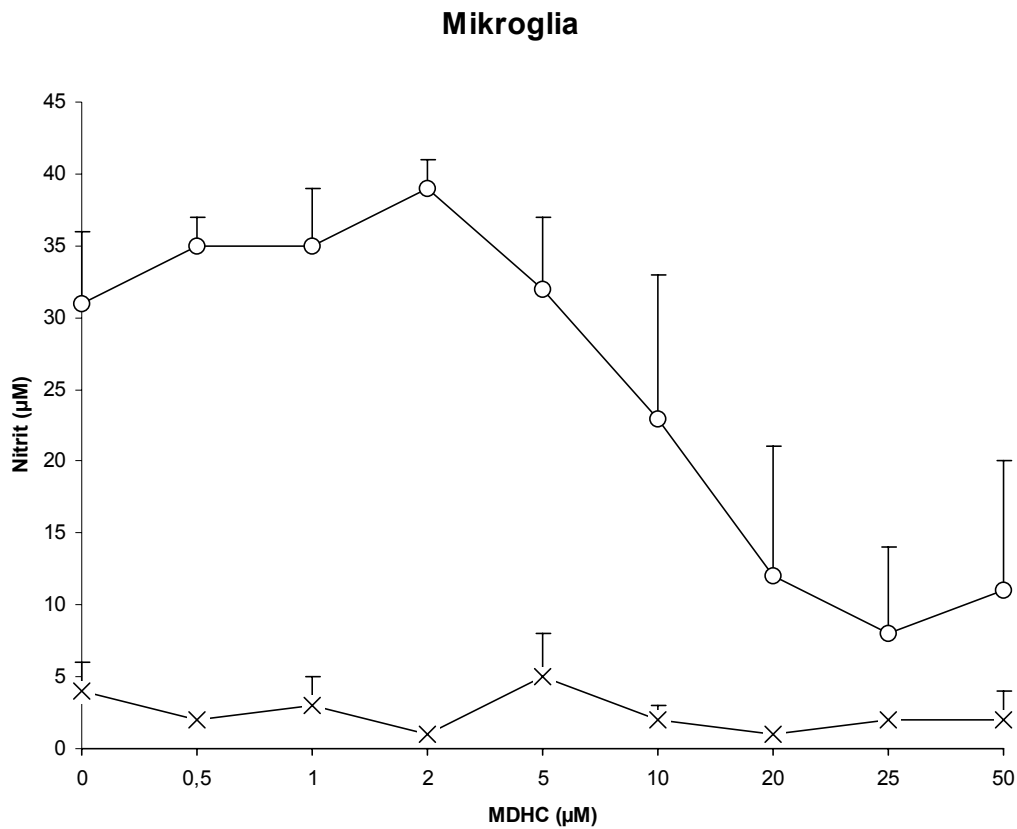
Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 15 -24 Messungen in 5-8 separaten Versuchen.

-x- =Inkubation mit MDHC

-□-= Inkubation mit LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), $\gamma\text{-IFN}$ (100 U/ml) und MDHC

Signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{M/l}$ MDHC ($p < 0,05$)

Abb. 7: Hemmung der Nitritproduktion in kultivierten Mikrogliazellen neugeborener Ratten durch steigende Konzentration von MDHC (0,5-50 $\mu\text{M/l}$) ab einer Konzentration von 20 $\mu\text{M/l}$ nach Induktion der NO-Synthase mit 100 U/ml γ -IFN und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS für 3 Tage.



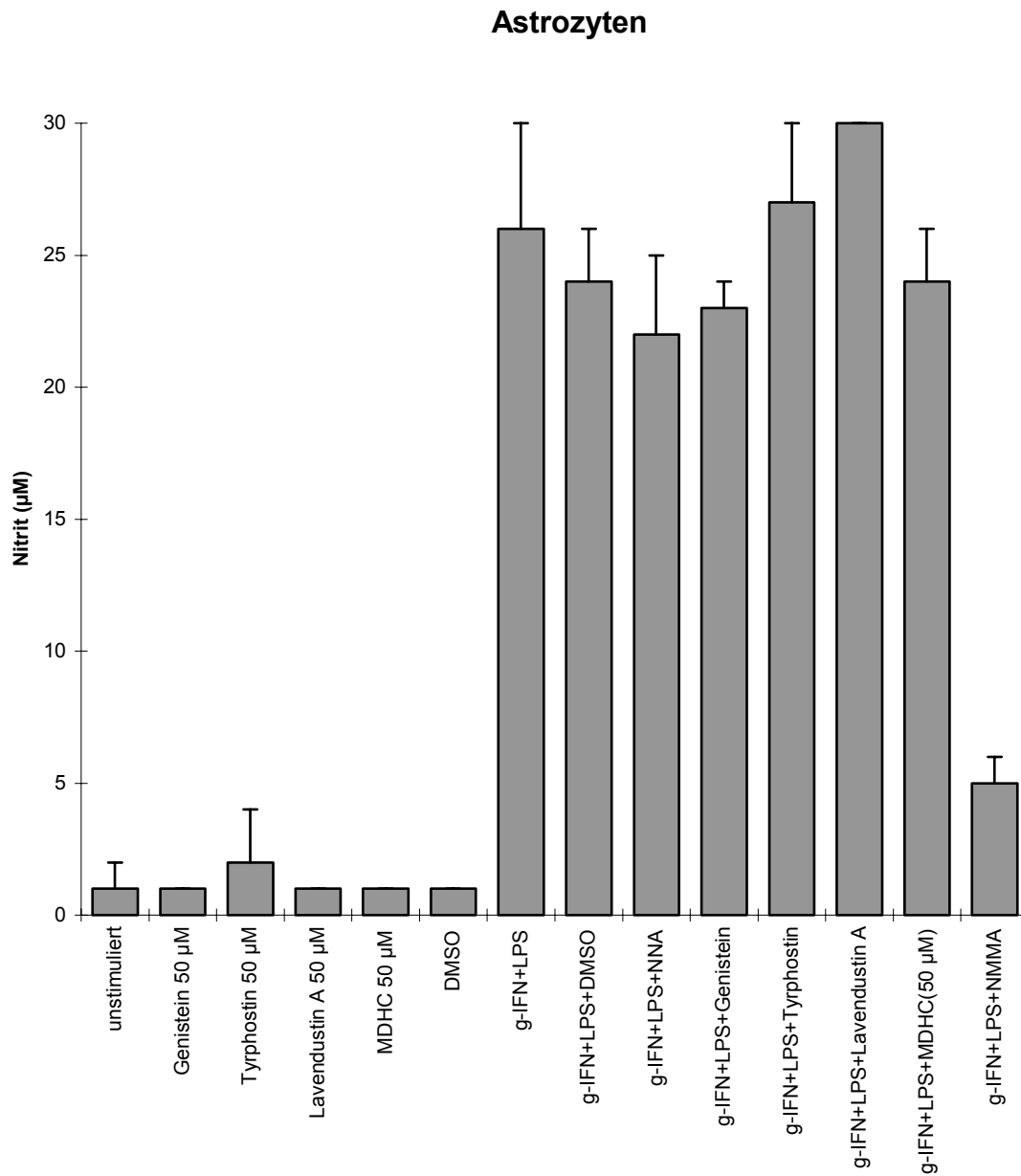
Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5-18 Messungen in 3-6 separaten Experimenten.

-x- = Inkubation mit MDHC

-o- = Inkubation mit γ -IFN (100 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) und MDHC

Signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 20 $\mu\text{M/l}$ MDHC ($p < 0,001$)

Abb. 8: Einfluß der Tyrosinkinaseinhibitoren Genistein, Tyrphostin, Lavendustin A und Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat (MDHC), sowie des Lösungsmittels DMSO auf die NO-Synthase mit und ohne Stimulation mit γ -IFN und LPS in Astrozyten-Kulturen neugeborener Lewis-Ratten



4. Diskussion

Durch Inkubation mit γ -IFN (100U/ml) oder LPS (1 μ g/ml) wird die Aktivierung der zytokininduzierbaren NO-Synthase in kultivierten Mausmakrophagen, Rattenmikrogliazellen und Astrozyten induziert. Zugabe von NMMA(100 μ M/l) führt zu einer deutlichen Hemmung der iNOS-Aktivität. Der Tyrosinkinaseinhibitor Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat ist ebenfalls in der Lage, dosisabhängig die Aktivität der iNOS in kultivierten Mausmakrophagen und Rattenmikrogliazellen zu hemmen. In höherer Dosierung (über 25 μ M) ist MDHC zytotoxisch. In unserem Zellkultursystem waren andere Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Genistein, Lavendustin A und Tyrphostin als iNOS-Inhibitor ineffektiv, sodaß anzunehmen ist, daß für MDHC ein eigener Signalübertragungsweg existiert. Dieser Signalübertragungsweg ist auch Zelltypspezifisch, da die zytokin-induzierbare NO-Sekretion in Makrophagen und Mikroglia, nicht jedoch in Astrozyten durch MDHC hemmbar war.

4.1. MDHC hemmt die zytokin-induzierbare NO-Synthase in Mikroglia und Makrophagen

Wir untersuchten verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Peptidtransmitter, Chemokine und Tyrosinkinaseinhibitoren auf ihre Fähigkeit zur Suppression der zytokin-induzierbaren NO-Synthase in Mikroglia, Peritonealmakrophagen, Astrozyten und J774A.1-Zellen.. Der Tyrosinkinasehemmer Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat (MDHC) war als einziger in der Lage, die zytokin-induzierte NO-Freisetzung in Makrophagen und Mikroglia signifikant zu hemmen. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen mit MDHC präinkubiert wurden oder ob eine Koinkubation der Zytokine vorgenommen wurde. MDHC wurde als stabileres Analogon von Erbstatin synthetisiert (206). MDHC besitzt zur Reduktion seiner Polarität eine Methylgruppe, die ihm das Eindringen in die Zelle ermöglicht. Der Wirkmechanismus erfolgt über Hemmung der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase und hat eine Störung des intrazellulären Signalübertragungsmechanismus zur Folge. In diesem Fall handelt es sich wohl um eine Unterbindung der durch LPS- bzw. γ -IFN -Bindung an ihren jeweiligen Rezeptor initiierten Wirkmechanismen, welche zur Hemmung der

iNOS-Transkription führt (206).

In höheren Dosierungen (50-100 μM) ist diese verminderte NOS-Produktion wohl auf einen zytotoxischen Effekt des MDHC zurückzuführen. So konnte kürzlich eine Apoptose-induzierende Wirkung von MDHC auf Thymozyten nachgewiesen werden, welche möglicherweise auf unsere Zellen übertragbar ist (4). Azuma und Mitarbeiter fanden nach Inkubation von Mausthymozyten mit Herbimycin A oder mit MDHC eine Abnahme des Phosphotyrosins im Zellkern sowie einen Anstieg der Apoptoserate, was den Zelltod zur Folge hat. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Apoptose eine Folge der Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der Kernproteine darstellt. Die genaue Rolle der Tyrosinkinasen bei der Apoptose ist unklar, wenn sie auch über Wachstumsfaktoren einen Einfluß nicht nur auf das Zellwachstum, sondern auch auf Überleben und Zelltod zu haben scheinen. Auch für Genistein konnte gezeigt werden, daß es zu einer Fragmentation von DNA führen kann. Jedoch tritt die Wirkung wesentlich schneller ein, sodaß ein anderer Wirkmechanismus vermutet wird (4). Im Vergleich mit Genistein, welches sowohl die lösliche als auch die membranassoziierte Proteintyrosinkinaseaktivität zu hemmen vermag, besitzt MDHC nur die Fähigkeit, membranassoziierte Proteintyrosinkinaseaktivität zu hemmen (202). Letzteres hat, im Gegensatz zu Genistein, keinen Einfluß auf die Histamin-stimulierte Aminopyrinakkumulation in Parietalzellen von Kaninchen. Diese Akkumulation konnte von beiden Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden, was darauf schließen läßt, daß hierin membranständige Proteintyrosinkinasen involviert sind. In unserem Modell scheinen auch eher membrangebundene Proteintyrosinkinasen eine Rolle zu spielen, da nur MDHC hemmte. MDHC zeichnet sich ferner dadurch aus, daß es als einziger Tyrosinkinase-Inhibitor bei der T-Zelllinie Molt 3 in kürzester Zeit dramatische Gestaltänderungen verursacht (24). Dies scheint, ähnlich wie unsere Ergebnisse, zu belegen, daß MDHC über einen anderen, möglicherweise eigenen Hemmungsweg als die übrigen Tyrosinkinasen agiert. Andere Tyrosinkinase-Inhibitoren waren lediglich in der Lage, die Adhäsion von T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen (Herbimycin A und Genistein), bzw. die Adhäsion von Neutrophilen an Fc-Fragmente (Erbstatin und Genistein) zu unterbinden. Die morphologische Änderung der T-Zellen durch MDHC war begleitet von einer Änderung der Tyrosyl-Phosphorylierung verschiedener Proteine. Sie erforderte die Aktivität cytoskelettaler Komponenten, ohne jedoch Mikrotubuli-Aktivität oder die Synthese neuer Proteine zu benötigen. MDHC unterbricht

möglicherweise das Gleichgewicht des Kinase/Phosphatase-Systems in einem Stoffwechselweg, der der Zelle signalisiert, ihre Form zu ändern. Für die Aufrechterhaltung der kugeligen Form der Zellen könnte eine kontinuierlich aktive Tyrosinkinase verantwortlich sein, die die Phosphorylierung eines wichtigen Tyrosinrests unterhält. Die Hemmung dieser Kinase durch MDHC könnte somit die normale Kontrolle über die Form unterbrechen und so zur Formänderung führen. Möglicherweise ist dieser Mechanismus auch für den Zelltod bei höheren Konzentrationen von MDHC in unseren Versuchen verantwortlich. Die Toxizität von MDHC und das enge „therapeutische Dosisfenster“ schränken die klinische Anwendung beim Menschen ein.

Bei MDHC-Konzentrationen von 0,05-25 μM war die Zellsterblichkeit gegenüber der Kontrollgruppe nicht erhöht und lag bei etwa 3-25 %. Der in diesem Konzentrationsbereich dennoch nachweisbare hemmende Effekt von MDHC auf die NO-Produktion kann also nicht auf die Zytotoxizität der Substanz zurückgeführt werden. Auch einen zellschädigenden Effekt des Lösungsmittels DMSO schlossen wir experimentell aus.

4. 2. Tyrosin-Phosphorylierung erfolgt als Reaktion der Zelle auf Rezeptor-Ligand-Interaktion.

Wie kann man sich eine Hemmung der NO-Synthase durch MDHC erklären? Am wahrscheinlichsten ist eine Unterbrechung der Signaltransduktionskaskaden, die durch die Bindung von LPS oder γ -IFN an die Zelloberfläche ausgelöst werden.

Weinstein et al. konnten zeigen, daß LPS-Stimulierung zu einer Zunahme der Tyrosin-Phosphorylierung in einer Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) und in Peritonealmakrophagen führt (216). Ob diese Phosphorylierung jedoch Folge einer veränderten Aktivität von Tyrosinkinase oder Tyrosinphosphorylasen ist, ist noch nicht bekannt. Dong et al. fanden eine Hemmbarkeit der LPS-vermittelten iNOS-Induktion in Makrophagen durch verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren (Genistein, Tyrphostin, Herbimycin A) (46). Tyrosinkinase spielen vermutlich eine wichtige Rolle im Signalübertragungsweg des LPS-Rezeptors in Makrophagen. Auch für den γ -IFN - Rezeptor wurde bereits eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer second messenger Proteine beschrieben (153, 184).

Andererseits ist auch die Stimulation der iNOS von der Aktivierung von Tyrosinkinase abhängig. Dies konnte in Astrozytenkulturen und bei C6-Gliomzellen durch Zugabe von Genistein oder Tyrphostin nach Stimulation mit LPS bzw. γ -IFN gezeigt werden (51). Genistein blockierte hierbei dosisabhängig ($IC_{50} = 40\mu M$) die zytokin-induzierbare NO-Synthase. Eine dauerhafte Anwesenheit des selektiven Tyrosinkinaseinhibitors war zur Hemmwirkung nicht erforderlich, während jedoch eine Präinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor zu einem Anstieg der Hemmwirkung führte. Der Abfall der iNOS-Aktivität korrelierte mit einem Rückgang der iNOS-mRNA (51). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden wir keine erhöhte Wirksamkeit von Genistein oder Tyrphostin.

Proteintyrosinkinase-Aktivität ist somit in den Signalübertragungsweg von LPS und anderen synthetischen, Bakterien-abstammenden Immunmodulatoren verwickelt, und zwar an einem Punkt, der der iNOS-Expression und der tumorizidalen Aktivität der Makrophagen vorausgeht (46). Daß in unseren Experimenten durch Genistein und Tyrphostin keine signifikante Hemmung der iNOS-Induktion erzielt wurde, mag an einer zellspezifischen Tyrosinkinaseaktivität liegen. Möglicherweise besitzen selbst unterschiedliche Makrophagenzelllinien verschiedene Tyrosinkinase. Dies bedarf

weiterer Untersuchungen.

Eine dosisabhängige Hemmung der LPS-vermittelten Tumortoxizität gelang mit Genistein, Herbimycin A und Tyrphostin (45, 46). Diese erklärt sich durch den Wegfall des schnellen Anstiegs der Tyrosin-phosphorylierung verschiedener Proteine nach Gabe von LPS zu Mausmakrophagen. Die durch Genistein, Herbimycin A und Tyrphostin erreichte Hemmung (in Konzentrationen von 20-50 μM) konnte durch Zusatz hoher LPS-Mengen nicht rückgängig gemacht werden. LPS bindet an seinen Oberflächenrezeptor CD14 und führt über komplexe intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden zur Stimulation LPS-sensitiver Gene (30, 173). Dabei spielt für die CD14-vermittelte iNOS-Aktivierung in Makrophagen und Gliazellen die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen (u. a. „mitogen-activated protein“ Kinasen, p42, p120) eine wichtige Rolle, der genaue Mechanismus ist noch unklar (2, 47, 72, 103, 104, 178, 211). Humane Mikroglia kann *in vitro* CD14 exprimieren (8). CD14-unabhängige Aktivierung der iNOS wurde bislang in Makrophagen nicht demonstriert. Für die iNOS-Induktion in Makrophagen scheint daneben die CD14-vermittelte Aktivierung von G-Proteinen eine zentrale Rolle zu spielen (175). Neben der NO-Produktion wird auch die Zytokin-Sekretion nach LPS-Gabe durch Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Genistein oder Tyrphostin A25 in Gliazellen gehemmt (105). In Zukunft wird die Untersuchung der Frage interessant sein, ob auch MDHC die LPS-vermittelte Zytokinproduktion hemmt.

4.3 γ -IFN induziert in unterschiedlichen Zellen jeweils verschiedene Signaltransduktionsmechanismen

In unserem Zellkulturmodell untersuchten wir die Hemmbarkeit der zytokin-induzierbaren NO-Synthase nach Gabe von γ -IFN und LPS. Nach Bindung an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche induziert γ -IFN eine intrazelluläre Signalkaskade durch die Aktivierung von Janus-Tyrosinkinasen und Proteinen der STAT-Familie (signal transduction and activator of transcription) (111). Diese werden phosphoryliert und können dann in den Zellkern eindringen, wo sie die Genexpression unter anderem der iNOS regulieren. Für die Induktion der iNOS spielt dabei als zweiter Signaltransduktions-Schritt der Interferon-regulatory factor-1 (IRF-1) die entscheidende Rolle. IRF-1 bindet in der Promotorregion des iNOS-Gens und aktiviert die Transkription (188). Makrophagen von Mäusen mit einer gentechnischen Deletion des IRF-1-Gens („IRF-1-Knockout Mäuse“) können kein NO mehr produzieren (98), jedoch reagieren Chondrozyten sehr wohl noch auf γ -IFN (183). Dies zeigt, daß γ -IFN in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Signaltransduktionsmechanismen induzieren kann. Dies könnte die von uns beobachteten Spezies- und Zellunterschiede der Wirksamkeit von MDHC und anderen Inhibitoren der Tyrosinkinase erklären, insbesondere die mangelnde Hemmbarkeit der zytokin-induzierbaren NO-Synthase in Astrozyten. In Mikroglia und Astrozyten werden durch γ -IFN neben mindestens acht anderen mRNAs auch STATs und IRF-1 hochreguliert (199, 208). Dies wird über ein p91 genanntes Signaltransduktionsprotein vermittelt (STAT1), dessen Bindungsaffinität an das IRF-1-Gen durch Tyrosin-Phosphorylierung moduliert wird (156). Auch die Aktivität von IRF-1 wird durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert (180). Ein zweites IRF-Gen (IRF-2) reguliert die NO-Produktion post-transkriptionell (168), es gibt keine Daten über den Einfluß von Proteinphosphorylierung auf die Aktivität dieses Proteins.

4. 4. Genistein, Lavendustin A und Tyrphostin hatten keine hemmende Wirkung auf die iNOS in Mausmakrophagen und Rattenmikrogliazellen

Erstaunlicherweise konnten Genistein und Tyrphostin keinen hemmenden Einfluß auf die iNOS in den verwendeten Makrophagen und Ratten-Mikrogliazellen nehmen. Beide Tyrosinkinasehemmer wurden bereits von Feinstein et al. (1994) als Inhibitoren der iNOS in Astrozyten und C6-Gliomzellen beschrieben (51). Durch Lavendustin A, 2-Hydroxy-5(2,5-Dihydroxybenzyl) Aminobenzoesäure oder MDHC zeigte sich kein Einfluß auf die Aktivität der iNOS bei den verwendeten Zellen. In unseren Experimenten war MDHC jedoch die einzige Substanz, die eine Hemmwirkung auf die induzierbare NOS in J774A.1-Makrophagen und in Mikrogliazellen ausüben konnte, während Genistein, Lavendustin A und Tyrphostin ineffektiv blieben. Die Astrozyten-iNOS scheint aufgrund dieser Beobachtung über einen anderen Mechanismus reguliert zu werden als die iNOS in Mikroglia und Makrophagen. Auch für die NO-Produktion im ZNS liegen somit unterschiedliche Regulationsmechanismen vor, die von der Zellart und der Art der NOS-Induktion abhängen.

Ein weiterer Grund für die fehlende Hemmwirkung mag in einer niedrigeren Konzentration des verwendeten Tyrosinkinasehemmers (50µM) in unseren Versuchen liegen. Wenngleich die Forschergruppe um Feinstein auch bei einer Konzentration von 10µM Genistein eine geringfügige Abnahme der relativen Aktivität der iNOS feststellten, ergab sich in unserer Arbeit keine wesentliche Abnahme der Nitritkonzentration nach Applikation von 50µM. Den höchsten Hemmeffekt allerdings erzielten Feinstein et al. nach Zugabe von 100µM des Tyrosinkinasehemmers. Tyrphostin war bei Feinstein et al. ebenfalls, in einer Konzentration von 10µM, in der Lage die iNOS-Aktivität zu hemmen. Für Genistein konnte nachgewiesen werden, daß es nur die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase in Mausmakrophagen hemmt, nicht jedoch die C-Proteinkinase (45, 46). Auch Akiyama et al. stellten bereits 1987 fest, daß die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase *in vitro* von Genistein gehemmt wird, während die Threonin- oder Serin-spezifischen Proteinkinasen kaum beeinflusst wurden (1). Dies scheint zu belegen, daß die verschiedenen Tyrosinkinasen hochspezifisch für ihren jeweiligen Rezeptor sind. Außerdem sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren für bestimmte Tyrosinkinasen spezifisch und haben daher wenig Einfluß auf andere zelluläre Prozesse (224).

Dennoch haben Tyrosinkinasehemmer auch einen Einfluß auf Tyrosinkinase-unabhängige Systeme. Sie beeinflussen nach Untersuchungen von Young et al. (1993) die Fettsäuresynthese, den Laktattransport, die mitochondriale oxidative Phosphorylierung und die Aldehyddehydrogenase (224). Insbesondere Tyrphostin, als Derivat von α -Cyano-Cinnamiden, ist ein potenter Hemmstoff des mitochondrialen Pyruvattransports. Solche unspezifischen Hemmeffekte können auch bei der Hemmung der NO-Produktion durch MDHC in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Einerseits könnte dadurch die iNOS-Aktivität direkt moduliert werden; andererseits könnten andere Stoffwechselwege von NO eingeschlagen werden, die zur Entstehung anderer Produkte als Nitrit führen. Bei der Hemmung der tumoriziden Wirkung von Mausmakrophagen (45) durch die Tyrosinkinase-Inhibitoren Genistein, Herbimycin A und Tyrphostin konnten unspezifische Hemmeffekte jedoch ausgeschlossen werden, sodaß wir es für unwahrscheinlich halten, daß dies unsere Befunde erklärt.

Als Bestandteil vieler Rezeptoren, an welche extrazelluläre Signalproteine binden, wie z. B. Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone, stellen Tyrosinkinasen ein wichtiges intrazelluläres Regulatorsystem dar (189). Auch hierbei ist die über sie vermittelte Wirkung ligandenspezifisch. Die Aktivierung der Kinase erfolgt über Bindung des Wachstumsfaktors an die extrazelluläre Domäne. Bindung von NGF, einem Neuronenwachstums- und -differenzierungsfaktor, an Fibroblasten führt zur Proliferation der Zellen. Bindet FGF, der Fibroblastenwachstumsfaktor, an Neuronen, führt dies zu deren Differenzierung und zum Schutz vor schädlichen Einflüssen. Auch in Neuronen ist die NO-Synthese durch Tyrosinkinasehemmer unterdrückbar, wie Rodriguez et al. anhand von kultivierten Striatum-Neuronen nach Applikation von Lavendustin-A und Genistein feststellten (163). Beide Inhibitoren waren in der Lage, die NMDA-abhängige c-GMP-Produktion irreversibel zu unterbinden, welche NO-abhängig ist. Die basale cGMP-Produktion wurde durch beide Inhibitoren nicht beeinflusst. Die NO-Produktion wird durch Lavendustin vermutlich auf Ebene der NO-Synthase selbst oder noch unbekannter Proteine, die die NOS-Aktivität regulieren, gehemmt. Die Calmodulin- Ca^{++} -Interaktion an sich bleibt unbeeinflusst. Dieser Mechanismus ist jedoch nicht auf die in unserer Arbeit untersuchte iNOS-Aktivität

übertragbar, da die Neuronen-NOS kalziumabhängig arbeitet und nicht mit der iNOS in Makrophagen und Mikroglia identisch ist.

Corbett et al. (1996) sowie Miller et al. (1997) zeigten, daß Genistein vor allem auf TNF- α - und IL-1-vermittelte Effekte hemmend wirkt (33, 135). Da wir γ -IFN und LPS als iNOS-Induktoren einsetzten, könnte dies die Diskrepanzen erklären. Auch Joly und Mitarbeiter (1997) zeigten, daß der iNOS-Hemmeffekt vom verwendeten Zelltyp und der Dosis abhängt. In ihren Untersuchungen an Endothel- und Muskelzellen war Geldanamycin ein guter NOS-Hemmer, während Genistein und Tyrphostin nur schwache Effekte zeigten (95). Für die IL-2-vermittelte NO-Produktion von Milzzellen war Genistein ohne Einfluß (96). Auf die zytokin-induzierbare NO-Produktion von Kupffer-Zellen hatten nur hohe Dosen von Genistein einen hemmenden Einfluß (87), auch Hellendall und Ting fanden eine Reduktion der iNOS-Produktion in Mikroglia durch Genistein (75). In Mausmakrophagen ist dieser Effekt relativ spezifisch, da die TNF-Sekretion nach Stimulation mit γ -IFN/LPS nur bei Präinkubation der Inhibitoren Genistein und Herbimycin A hemmbar ist, nicht aber bei Koinkubation (148).

Demgegenüber wird die iNOS-Induktion auch bei der Koinkubation gehemmt.

Williams et al. stellten 1994 fest, daß Genistein, Lavendustin A und Tyrphostin 34 und 47 keinen Einfluß auf das Integrin-abhängige oder CAM (Cell adhesion molecule)-stimulierte Neuritenwachstum haben. Tyrphostin 25 sowie ein Erbstatin-Analogon dagegen konnten das CAM-abhängige Neuritenwachstum spezifisch hemmen (218).

Auch dies zeigt einen unterschiedlichen Wirkmechanismus der verschiedenen Tyrosinkinasehemmer an. Die Aktivierung der Erbstatin-sensitiven Tyrosinkinase scheint ein wichtiger Schritt zur Ca^{++} -Kanalaktivierung im Second-messenger-Weg zu sein, der dem Neuritenwachstum zugrunde liegt und durch eine Vielzahl von CAM stimuliert wird. *In vivo* hatte Genistein nur einen milden entzündungshemmenden Effekt in einem Tiermodell der chronischen Ileitis, wobei ein enges therapeutisches Fenster auffiel (167). Dies könnte durch eine Induktion von Sauerstoffradikalen bedingt sein (28), die der NOS-Hemmung entgegenläuft.

4.5 Einfluß des Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine auf den Oxidative Burst und andere Zellfunktionen

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, daß Tyrosinphosphorylierungs-Prozesse zur Aktivierung der iNOS durch γ -IFN und LPS in Makrophagen und Mikroglia von großer Bedeutung sind. Daß der Phosphorylierungsstatus intrazellulärer Proteine generell an der Regulierung von Makrophagenfunktionen mitwirkt, konnten Green et al. (1992) anhand der „respiratory burst“- Aktivität von Makrophagen aus dem Knochenmark zeigen (65). Zymosan, ein Stimulator der Makrophagenatmungskette, triggerte die Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität. TNF- α , γ -IFN und LPS, welche die Zymosan-getriggerte Atmungskettenaktivität erhöhen, führten auch zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung durch Zymosan. Beides konnte durch die Tyrosinkinase-inhibitoren Herbimycin A und Cyano-3-Ethoxy-4-Hydroxy-5-Phenylmethylcinnamid gehemmt werden und war durch Zugabe von Vanadat, einem Inhibitor der Phosphotyrosinphosphatase, stimulierbar. Auch Kitamura et al. (1996) fanden eine Hemmung der Rattenglia-iNOS durch Herbimycin A, jedoch verwendeten sie hohe Dosen an Kulturen, die im Gegensatz zu unseren vorwiegend Astrozyten enthielten (103).

Auch Bennett et al. fanden einen Anstieg an phosphorylierten Tyrosinen und eine erhöhte „respiratory burst“- Aktivität von Polymorphkernigen Leukozyten nach Behandlung mit Vanadylhydroperoxid (10). Die Induktion dieses Oxidationszyklus konnte durch Erbstatin, einen Tyrosinkinaseinhibitor, der ein Vorläufer des in unserer Studie verwendeten Methyl-2,5-Dihydroxycinnamats ist, aufgehoben werden. Die dabei verwendete Konzentration entsprach der, die in unserer Studie eingesetzt wurde. Diesen Ergebnissen zufolge wird die Phagozytenaktivierung durch den Spiegel intrazellulär phosphorylierter Tyrosine kontrolliert. Außerdem kann anhand unserer Ergebnisse eine ähnliche Rolle bei der Tyrosinphosphorylierung in Mikrogliazellen angenommen werden. Schon 1989 konnten Tillotson und Wood in verzweigter (ramifizierter) als auch in amöboider Mikroglia phosphorylierte Tyrosine nachweisen (201).

Auch in Gebieten vorübergehender zerebraler Ischämie findet sich ein Anstieg der Phosphotyrosin-Immunoreaktivität (107). Dies läßt vermuten, daß eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation von Mikrogliazellen *in vivo* erfolgt.

Nach Abschluß unserer Arbeiten haben mehrere Arbeitsgruppen experimentell zeigen können, daß die EAE der Maus durch Tyrphostin hemmbar ist (19, 20, 31, 32, 106). Neben der Hemmung der iNOS haben dabei jedoch auch andere biologische Wirkungen der Tyrosinkinase-Hemmung wie z. B. Inhibition der Freisetzung von TNF- α oder Hemmung der Adhäsion von Entzündungszellen an Endothelzellen eine Rolle gespielt. Da in unserem experimentellen System Tyrphostin die LPS- und γ -IFN-vermittelte NO-Produktion von Makrophagen und Mikrogliazellen nicht zu inhibieren vermochte, dürften die Effekte von Tyrphostin auf die Zytokinfreisetzung das wirksame Hemmprinzip bei der EAE *in vivo* dargestellt haben.

Tyrosinkinasen sind für viele zelluläre Mechanismen, wie die Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette, Adhäsionsvorgänge, Tumortoxizität und Morphologieänderungen, erforderlich. Verschiedene Zellen besitzen unterschiedliche Tyrosinkinasen für identische Funktionen. Diese Tyrosinkinasen sind jeweils durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren hemmbar. Auch die Induktion der iNOS ist nach unseren Ergebnissen ein Tyrosinkinase-abhängiger Stoffwechselweg. Hierbei wirken ebenfalls nur ganz bestimmte Tyrosinkinaseinhibitoren bei den einzelnen Zellarten als potente Hemmstoffe und sind bei anderen Zelltypen ineffektiv.

Zusammengefaßt zeigen diese teilweise widersprüchlichen Ergebnisse, daß die Wirkung von Tyrosinkinase-Hemmern von vielen Faktoren abhängt: Sie ist abhängig von der Art des untersuchten Zellkultursystems, den Stimulationsbedingungen und der untersuchten Zellfunktion.

4.6. Fehlende Hemmung der iNOS durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, Neuropeptide, Peptidtransmitter und Chemokine

Bei den anderen in unserer Studie getesteten Substanzen konnte kein Hemmeffekt auf die induzierbare NO-Synthase nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor, FGF, überraschend, da Goureau et al. (1993), die die iNOS von retinalen pigmentierten Epithelzellen von Rindern untersuchten, eine deutliche Hemmbarkeit des Enzyms durch FGF fanden (63). Die Regulation der iNOS scheint nach diesen Ergebnissen für einzelne untersuchte Zellarten auf unterschiedliche Weise zu erfolgen. Die Hemmung der NO-Synthase in benachbarten Makrophagen und Mikrogliazellen scheint für die protektive und wachstumsfördernde Wirkung nicht von Bedeutung zu sein.

Auch andere zytoprotektiv wirkende Wachstumsfaktoren scheinen diese Funktion nach diesen Ergebnissen nicht über Hemmung der Zytokin-induzierten NO-Synthase auszuüben. Für EGF jedoch ist ein Schutz vor der toxischen NO-Wirkung in Hippocampusneuronen nach anoxischer Schädigung beschrieben (128). Es muß, nach der vorliegenden Studie, vermutet werden, daß hier ein anderer Mechanismus zugrundeliegt, zumal hier andere Zellen vorliegen, welche keine LPS-induzierbare NO-Synthase besitzen (55).

NGF, dem ein hoher neuroprotektiver Effekt zukommt, hatte ebenfalls keinen hemmenden Einfluß auf die iNOS in den verwendeten Zellen. Es ist für diesen Wachstumsfaktor jedoch ein Einfluß auf den Glutathion-Metabolismus in Ratten-Phäochromozytomzellen beschrieben, wodurch die Konzentration an freien Radikalen und der damit verbundene oxidative Stress verringert werden (150).

Auch die IGF I und II sind für die Entwicklung des Nervensystems und dessen Erholung nach Traumata, Entzündung und Infektionen von Bedeutung. Auf die induzierbare NO-Synthase haben sie nach unseren Erkenntnissen keinen Einfluß. Interleukin-6 fördert ebenfalls die Nervenzelldifferenzierung (169) und die Astrozytenproliferation sowie die Neuvaskularisation nach Hirntraumata (100). Taga et al. vermuten eine stimulierende Wirkung des IL-6 auf die Nitritproduktion in Zellen einer Myeloischen Leukämie (195). Wir konnten bei Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten weder eine hemmende noch eine stimulierende Wirkung des IL-6 auf die iNOS feststellen.

Interleukin-10 ist in der Lage, die LPS- bzw. γ -IFN -induzierte Zytokinproduktion (IL-1, IL-6, TNF- α) in T2-Helferzellen zu hemmen (54). Bei der EAE wird IL-10 erst im späteren Stadium induziert, wobei IL-10 eine immunsuppressive Bedeutung zukommt (99). Dies, in Verbindung mit der Tatsache, daß IL-10 andere LPS- oder γ -IFN -vermittelte Mechanismen zu hemmen vermag, und daß eine Hemmung der NO-Produktion von γ -IFN -aktivierten Makrophagen (die allerdings von endogener TNF-Produktion abhängig ist) durch IL-10 bereits beschrieben ist, waren Anlaß, das Zytokin auf eine mögliche Hemmung der LPS- und γ -IFN - induzierten NO-Synthase zu untersuchen. Diese Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch die übrigen in unserer Studie getesteten Substanzen LIF, NPY, PYY, Substanz P, Neurotensin, Neuromedin N, Oncostatin M, CNTF, MIP-1 α , RANTES und MCP-1 waren in unserem Zellkultursystem bei der Hemmung der Zytokin-induzierten NO-Synthase nicht effektiv. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß diese Substanzen auf die iNOS in anderen Zellpopulationen hemmend wirken könnten.

Da nach unseren Ergebnissen die iNOS-Induktion ein Tyrosinkinase-abhängiger Stoffwechselweg ist, erfolgt die Wirkung der von uns getesteten Wachstumsfaktoren, Interleukine und Neuropeptide wahrscheinlich nicht über Hemmung des schnellen Anstiegs der intrazellulären Tyrosinphosphorylierung nach Zugabe von LPS bzw. γ -IFN zu Makrophagen und Mikrogliazellen.

5. Zusammenfassung

Stickoxid (NO) spielt neben anderen zytotoxischen Substanzen, wie Sauerstoffradikalen und Proteasen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von degenerativen, ischämischen und traumatischen ZNS-Erkrankungen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, einen oder mehrere Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Peptidtransmitter, Neuropeptide, Chemokine und Tyrosinkinaseinhibitoren) als Hemmstoff der iNOS in Mikroglia und Makrophagen zu identifizieren. Idealerweise sollte dieser Stoff auch therapeutisch zur Anwendung kommen können. Hierzu wurden kultivierte Makrophagen und Mikrogliazellen neugeborener Ratten nach Stimulation mit γ -IFN bzw. LPS mit der Testsubstanz inkubiert. Nach 72 Stunden wurde jeweils die Nitritkonzentration in den Zellkulturüberständen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung der zytokin-induzierbaren NO-Synthase in Makrophagen und Mikroglia-Zellen durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Methyl-2,5-Dihydroxycinnamat gehemmt werden kann. Daraus kann geschlossen werden, daß der Aktivierungsstatus der induzierbaren NO-Synthase in Mikrogliazellen, ähnlich wie in Makrophagen und Rattenastrozyten, über Tyrosinphosphorylierung reguliert wird. Da in anderen Zellkultursystemen aktive Tyrosinkinase-Inhibitoren (Tyrphostin, Genistein, Lavendustin A) keine signifikante Hemmung der iNOS zur Folge hatten, ist ein spezieller MDHC-sensitiver Signalübertragungsmechanismus in Makrophagen anzunehmen. Am wahrscheinlichsten ist eine hemmende Wirkung auf die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die durch LPS-Bindung an die Zelloberfläche ausgelöst wird, bzw. durch Bindung von γ -IFN an spezifische Rezeptoren mit letztendlicher Regulierung der iNOS-Genexpression .

MDHC ist in höheren Konzentrationen (über 25 μ M) zytotoxisch. Diese Wirkung erfolgt möglicherweise über eine Apoptoseinduktion und schränkt die mögliche Bedeutung als Therapeutikum ein.

Die anderen untersuchten Substanzgruppen (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Peptidtransmitter, Neuropeptide und Chemokine) hatten keinen Einfluß auf die Aktivität der zytokin-induzierbaren NO-Synthase.

Ein therapeutischer Ansatz zur Eindämmung des Erkrankungsausmaßes ischämischer, traumatischer oder entzündlicher Gehirnläsionen sowie zur Verminderung des Zellschadens bei immunologisch vermittelten demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen könnte in der Hemmung der Freisetzung von toxischen Substanzen aus Mikrogliazellen liegen. Die von uns gefundene Mikroglia-spezifische Inhibition der iNOS durch MDHC sollte daher in Tiermodellen solcher Erkrankungen untersucht werden. Ein Nachteil von MDHC ist jedoch seine Toxizität, die möglicherweise ein enges therapeutisches Dosisfenster zur Folge hat.

6. Literatur

1. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-I., Itoh N., Shibuya M and Fukami Y.:
Genistein, a Specific Inhibitor of Tyrosine-specific Protein Kinases.
J. Biol. Chem. **262**, 5592-5595, 1987
2. Arditi M., Zhou J., Torres M., Durden D. L., Stins M. and Kim K. S.:
Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42 and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD 14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells.
J. Immunol. **155**, 3994-4003, 1995
3. Aronin N., Coslousky R. and Leeman S. E.:
Substance P and Neurotensin: Their roles in the regulation of anterior pituitary function.*Annu. Rev. Physiol.* **48**, 537-549, 1986
4. Azuma Y., Onishi Y., Sato Y. and Kizaki H. :
Induction of mouse thymocyte apoptosis by inhibitors of tyrosine kinases is associated with dephosphorylation of nuclear proteins.
Cell. Immunol. **152**, 271-278, 1993
5. Ballard J., Baxter R., Binoux M., Clemmons D. et al.
On the nomenclature of the IGF-binding proteins.
Acta Endocrinol. **121**, 751-752,1989
6. Baumann H. and Wong G.G. :
Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor.
J. Immunol. **143**, 1163-1167,1989
7. Bazan J. F.:
Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold.
Neuron **7**, 197-208, 1991
8. Becher B., Fedorowicz V. and Antel J. P.:
Regulation of CD14 expression on human adult central nervous system-derived microglia.
J. Neurosci. Res. **45**, 375-381, 1996
9. Belew M. and Ebendal T.:
Chick embryo nerve growth factor fraction and biological activity.
Exp. Cell Res. **167**, 550-558, 1986
10. Bennett P. A., Finan P. M., Dixon R. J. and Kellie S.:
Tyrosine phosphatase antagonist-induced activation of the neutrophil NADPH oxidase: a possible role for protein kinase C.
Immunol. **85**, 304-310, 1995

11. Betz-Corradin S., Muel J., Dennis Donini S., Quattrocchi E. and Ricciardi-Castagnoli P.:
Inducible Nitric Oxide Synthase Activity of Cloned Murine Microglial Cells.
Glia **7**, 255-262, 1993
12. Blalock J. E. and Smith F. M.:
A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrinesystems.
Fed. Proc. **44**, 108-111, 1985
13. Bö L., Dawson T. M., Wesselingh S., Mörk S., Choi S., Kong P.A., Hanley D. and Trapp B. D.:
Induction of nitric oxide synthase in demyelinating regions of multiple sclerosis brains.
Ann. Neurol. **36**, 778-786, 1994
14. Boje K. M. and Arora P. K.:
Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death.
Brain Res. **587**, 250-256, 1992
15. Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P. and Lipton S. A.:
Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 7162–7166, 1995
16. Bradshaw R. A., Dumbbar J. C., Isackson P. J. et al.:
Nerve growth factor: mechanism of action.
Mediators in cell growth and differentiation, edited by Ford J. and Maizel L., 87-101, New York, Raven Press, 1985
17. Bredt D. S. and Snyder S. H.:
Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-depending enzyme.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 682-685, 1990
18. Bredt D. S. and Snyder S. H.:
Nitric Oxide, a Novel Neuronal Messenger.
Neuron **8**, 3-11, 1992
19. Brenner T., Poradosu E., Soffer D., Sicsic C., Gazit A. and Levitzki A.:
Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by tyrphostin AG-556.
Exp. Neurol. **154**, 489-498, 1998
20. Bright J. J., Du C. and Sriram S.;
Tyrphostin B42inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis.
J. Immunol. **162**, 6255-6262, 1999

21. Brown T. J., Lioubin M. N. and Marquardt H.:
Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes.
J. Immunol. **139**, 2977-2983, 1987
22. Bruni A., Bigon E., Boarato E., Leon A. and Toffano G.:
Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells.
FEBS. Lett. **138**, 190-192, 1982
23. Bukrinsky M. I., Nottet H. S., Schmidtayerova H., Dubrovsky L., Flanagan C. R., Mullins M. E., Lipton S. A. and Gendelman H. E.:
Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease.
J. Exp. Med. **181**, 735-745, 1995
24. Butler Y. X., Tibbetts S. A., Chirathaworn C. and Benedict S. H.:
Modulation of T cell morphology and induction of homotypic adhesion by a tyrosine kinase inhibitor.
Cell. Immunol. **163**, 129-138, 1995
25. Buttini M, Limonta S. and Boddeke H. W. G. M.:
Peripheral administration of lipopolysaccharide induces activation of microglial cells in rat brain.
Neurochem. Int. **1**, 25-35, 1996
26. Carpenter G., Cohen S.:
Epidermal growth factor.
J. Biol. Chem. **265**, 7709-7712, 1990
27. Carraway R. E. and Leeman S. E.:
The isolation of new hypotensive peptide neurotensin from bovine hypothalami.
J. Biol. Chem. **248**, 6854-6861, 1973
28. Carreras M. C., Riobo G. A., Boveris A. and Poderoso J. J.:
Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils.
Free Radic. Res. **26**, 325-334, 1997
29. Chao C. C., Hu S., Molitor T. W., Shaskan E. G. and Peterson P. P.:
Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism.
J. Immunol. **149**, 2736-2741, 1992
30. Chow C. W., Grinstein S. and Rotstein O. D.:
Signaling events in monocytes and macrophages.
New. Horiz. **3**, 342-351, 1995

31. Constantin G., Brocke S., Izikson A., Laudanna C. and Butcher E. C.:
Tyrphostin AG490, a tyrosine kinase inhibitor, blocks actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis.
Eur. J. Immunol. **28**, 3523-3529, 1998
32. Constantin G., Laudanna C., Brocke S. and Butcher E. C.:
Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by a tyrosine kinase inhibitor.
J. Immunol. **162**, 1144-1149, 1999
33. Corbett J. A., Kwon G., Marino M. H., Rodl C. P., Sullivan P. M., Turk J. and McDaniel M. L.:
Tyrosine kinase inhibitors prevent cytokine-induced expression of iNOS and COX-2 by human islets.
Am. J. Physiol. **270**, C1581-C1587, 1996
34. Cross H. A., Misko T. P., Lin R. F., Hickey W. F., Trotter J. L. and Tilton R. G.:
Aminoguanidin, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice.
J. Clin. Invest. **93**, 2684-2690, 1994
35. Danger J. M., Tonon M. C., Jenks B. G., Saint-Pierre S., Martel J. C., Fasalo A., Breton B., Quirion R. Pelletier G. and Vaudry H.:
Neuropeptide Y: localisation in the central nervous system and neuroendocrine functions.
Fundam. Clin. Pharmacol. **4**, 307-340, 1990
36. Daughaday W. H., Hall K., Salmon W. D., van den Brande J. L. and van Wyk J. J.:
Letter to the editor: on the nomenclature of the somatomedins and insulin-like growth factors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **65**, 1075-1077, 1987
37. Davis S., Aldrich T. H., Valenzuela D. M., Wong V. V., Furth M. E., Squinto S. P. and Yancopoulos G. D.:
The receptor for ciliary neurotrophic factor.
Science **253**, 59-63, 1991
38. De la Fuente M., Bernaez I., Del Rio M. and Hernanz A.:
Stimulation of murine peritoneal macrophage functions by neuropeptide Y and peptide YY. Involvement of protein kinase C.
Immunol. **80**, 259-265, 1993;
39. De la Fuente M., Del Rio M., Fernandez D. and Hernanz A.:
Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C.
Immunol. **73**, 205-211, 1991
40. De la Fuente M., Garrido J. J., Arahuetes R. M. and Hernanz A.:
Stimulation of phagocytic function in mouse macrophage by neurotensin and neuromedin N.
J. Immunol. **42**, 97-103, 1992

41. De Quidt M. E. and Emson P. C.:
Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system- the immunohistochemical analysis.
Neuroscience **18**, 545- 618, 1986
42. De Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C. G. and de Vries J. E.:
Interleukin 10 Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of IL-10 Produced by Monocytes.
J.Exp.Med. **174**, 1209-1220, 1991
43. Dinarello C. A. and Mier J. W.:
Lymphokines.
New Engl. J. Med. **8**, 940-945, 1987
44. Dobner P. R., Barber D. L., Villa-Komaroff L. and McKiernan C.:
Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/ neuromedin N precursor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 3516-3520, 1987
45. Dong Z., O'Brian C. A. and Fidler I. J.:
Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity.
J. Leucocyte Biol. **53**, 53-59, 1993
46. Dong Z., Qi X., Xie K and Fidler I. J.:
Protein Tyrosine Kinase Inhibitors Decrease Induction of Nitric Oxide Synthase Activity in Lipopolysaccharide-Responsive and Lipopolysaccharide-Nonresponsive Murine Macrophages.
J. Immunol. **151**, 2717-2723, 1993
47. Eason S. and Martin W.:
Involvement of tyrosine kinase C in the induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharide and interferon-gamma in J774 macrophages.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. **330**, 225-240, 1995
48. Ebendal T., Olson L., Seiger A. and Hedlund K. O.:
Nerve growth factors in the rat iris.
Nature **286**, 25-28, 1980
49. Everitt B. J., Hökfelt T., Terenius L, Tatemoto K., Mutt V. and Goldstein M.:
Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat.
Neuroscience **11**, 443-462, 1984
50. Feinstein D. L., Galea E., Berquist H., Wang H. and Reis D. J.:
Induction of nitric oxide synthase in rat C6 glioma cells.
J. Neurochem. **62**, 125-128, 1993

51. Feinstein D. L., Galea E., Cermak J., Chugh P., Lyandvert L. and Reis D. J.:
Nitric Oxide Synthase Expression in Glial Cells : Suppression by Tyrosine Kinase Inhibitors.
J. Neurochem. **62**, 811-814, 1994
52. Felten D. L., Felten S. Y., Bellinger D. L. and Lorton D.:
Noradrenergic and peptidergic innervation of secondary lymphoid organs: role in experimental rheumatoid arthritis.
Eur. J. Clin. Invest. **22**, Suppl. 1, 37-41, 1992
53. Fenyk-Melody J. E., Garrison A. E., Brunnert S. R., Weidner J. R., Shen F., Shelton B. A. and Mudgett J. S.:
Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking the NOS2 gene.
J. Immunol. **160**, 2940-2946, 1998
54. Fiorentino D. F., Bond M. W. and Mosmann T. R.:
Two types of mouse helper T cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.
J. Exp. Med. **170**, 2081-2095, 1989
55. Galea E. Feinstein D. L. and Reis D. J.:
Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 10945-10949, 1992
56. Gall C. and Isackson P.:
Limbic seizures increase neuronal production of messenger RNA for nerve growth factor.
Science **245**, 758-761, 1989
57. Gao J.-L., Kuhns D. B., Tiffany L., McDermott D., Li X., Francke U. and Murphy P. M.:
Structure and Functional Expression of the Human Macrophage Inflammatory Protein 1a/Rantes Receptor.
J. Exp. Med. **177**, 1421-1427, 1993
58. Gearing D. P., Thut C. J., VandeBos T., Gimpel S. D., Delaney P. B., King J., Price V., Cosman D. and Beckmann M. P.:
Leukemia inhibitory factor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130.
EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. **10**, 2839-2848, 1991
59. Gehrman J., Matsumoto Y. and Kreutzberg G. W.:
Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain.
Brain Res. Rev. **20**, 269-287, 1995
60. Gemsa D., Kalden J. R. and Resch K.:
Immunologie: Grundlagen, Klinik, Praxis 1997; S. 53-55, S. 156-157

61. Gensburger C., Labourdette G. and Sensenbrenner M.:
Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro.
FEBS Lett. **217**: 1-5, 1987
62. Gold R., Zielasek J., Kiefer R., Toyka K. V. and Hartung H. P.:
Secretion of nitrite by Schwann cells and its effect on T-cell activation in vitro.
Cell. Immunol. **168**, 69-77, 1996
63. Goureau O., Lepoivre M. Becquet F. and Courtois Y.:
Differential regulation of inducible nitric oxide synthase by fibroblast growth factors and transforming growth factor β in bovine retinal pigmented epithelial cells: Inverse correlation with cellular proliferation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 4276-4280, 1993
64. Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S. and Tannenbaum R.:
Analysis of Nitrite, Nitrate and (15 N) Nitrate in Biological Fluids.
Anal. Biochem. **126**, 131-138, 1982
65. Green S. P., Hamilton J. A. and Phillips W. A.:
Zymosan-triggered tyrosine phosphorylation in mouse bone-marrow-derived macrophages is enhanced by respiratory-burst priming agents.
Biochem. J. **288**, 427-432, 1992
66. Guan D., Maouyo D., Taylor I. L., Gettys T. W. and Greeley G. H.Jr.:
Peptide-YY, a new partner in the negative feedback control of pancreatic secretion.
Endocrinol. **128**, 911-916, 1991
67. Hagg T., Varon S. and Louis J.-C.:
Ciliary neurotrophic factor (CNTF) promotes low-affinity growth factor receptor and CD4 expression by rat CNS microglia.
J. Neuroimmunol. **48**, 177-188, 1993
68. Hamburger V. J. K., Brunso-Bechtold J. W. and Yip J. W.:
Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor.
J. Neurosci. **1**, 60-71, 1981
69. Hartung H.-P., Jung S., Stoll G., Zielasek J., Schmidt B., Archelos J. J. and Toyka K. V.:
Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS.
J. Neuroimmunol. **40**, 197-210, 1992
70. Hartung H. P. and Toyka K. V.:
Activation of macrophages by Substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release.
Eur. J. Pharmacol. **98**, 301-305, 1983

71. Hartung H.-P., Wolters K. and Toyka K. V.:
Substance P: Binding Properties and Studies on Cellular Responses in Guinea Pig Macrophages.
J. Immun. **136**, 3856-3862, 1986
72. Hattori Y., Kasai K., Akimoto K. and Thiemermann C.:
Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in J774 macrophages: involvement of a CD14- dependent pathway.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **23**, 375-379, 1997
73. Heilig M. and Widerlöv E.:
Neuropeptide Y: an overview of central distribution, functional aspects and possible involvement in neuropsychiatric illnesses.
Acta Psychiatr. Scand. **82**, 95-98, 1990
74. Heinemann V. und Jehn U.:
Wachstumsfaktoren.
Klin. Wschr. **63**, 740-746, 1985
75. Hellendall R. P. and Ting J. P.:
Differential regulation of cytokine-induced major histocompatibility complex class II expression and nitric oxide release in rat microglia and astrocytes by effectors of tyrosine kinase, protein kinase C and cAMP.
J. Neuroimmunol. **74**, 19-29, 1997
76. Helme R. D., Eglezos A., Dandie G. W., Andrews P. V. and Boyd R. L.:
The effect of substance P on the regional lymph node antibody response to antigenic stimulation in capsaicin-pretreated rats.
J. Immunol. **139**, 3470-3473, 1987
77. Hempstead B. L., Martin-Zanca D., Kaplan D. R., Parada L. F. and Chao M. V.:
High- affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor.
Nature **350**, 678-683, 1991
78. Hendry I.A.:
Effects of axotomy on the trans-synaptic regulation of enzyme activity in adult rat superior cervical ganglia.
Brain Res. **107**, 105-116, 1976
79. Hibbs J. B., Vavrin Z. and Taintor R. R.:
L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells.
J. Immunol. **138**, 550-565, 1987
80. Hintz R. L.:
Insulin-like growth factor-binding proteins, edited by Drop S. L. S. and Hintz R. L., Elsevier Science Publishers, Holland, 1989

81. Hooper D. C., Ohnishi S. T., Kean R., Numagami Y., Dietzschold B. and Koprowski H.:
Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 5312-5316, 1995
82. Horn D., Fitzpatrick W. C., Gompper P. T., Ochs V., Bolton-Hansen M., Zarling J., Todaro G. J. and Linsley P. S.:
Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M.
Growth Factors **2**, 157-165, 1990
83. Howard M., Muchamuel T., Andrade S. and Menon S.:
Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia.
J. Exp. Med. **177**, 1205-1208, 1993
84. Hsu C. J., Persons P. E., Spada A. P., Bednar R. A., Levitzki A. and Silberstein A.:
Kinetic analysis of the inhibition of epidermal growth factor tyrosine kinase by lavendustin-A and analogue.
J. Biol. Chem. **266**, 21105-21112, 1991
85. Huitinga I., Ruuls S. R., Van R. N., Hartung H. P. and Dijkstra C. D.:
Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats.
Clin. Exp. Immunol. **100**, 344-351, 1995
86. Hunter T. A.:
Thousand and one protein kinase.
Cell. **50**, 823-829, 1987
87. Ikeda K., Kubo S., Hirohashi K., Kinoshita H., Kaneda K., Kawada N., Sato E. F. and Inoue M.:
Mechanism that regulates nitric oxide production by lipopolysaccharide-stimulated rat Kupffer cells.
Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. **28**, 239-253, 1996
88. Ip N. Y., McClain J., Barrezueta N. X., Aldrich T. H., Pan L., Li Y., Wiegand S. J., Friedman B., Davis S. and Yancopoulos G. D.:
The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development.
Neuron **10**, 89-102, 1993
89. Ip N. Y., Nye S. H., Boulton T. G., Davis S., Taga T., Li Y., Birren S. J., Yasukawa K., Kishimoto T. and Anderson T. G.:
CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130.
Cell **69**, 1121-1132, 1992

90. Ip N. Y., Li Y. P., vandeStadt I., Panayotatos N., Alderson R. F. and Lindsay R. M.:
Ciliary neurotrophic factor enhances neuronal survival in embryonic rat hippocampal cultures.
J. Neurosci. **11**, 3124-3134, 1991
91. Ishikawa R., Nishikori K., Furukawa Y., Hayashi K. and Furukawa S.:
Injury-induced reduction of acidic fibroblast growth factor levels in the distal parts of rat sciatic nerve.
Neurosci. Lett. **235**, 113-116, 1992
92. Iversen L. L.:
Substance P.
Br. Med. Bull. **38**, 277-282, 1982
93. Jackson G. R., Werrbach-Perez K, Ezell E. L., Post J. F. M. and Perez-Polo J. R.:
Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after injury of rat pheochromocytoma cells.
Brain Res. **592**, 239-248, 1992
94. Jazin E. E., Zhang X., Söderström S., Williams R., Hökfelt T., Ebendal T. and Larhammar D.:
Expression of peptide YY and mRNA for the NPY/PYY receptor of the Y1 subtype in dorsal root ganglia during rat embryogenesis.
Develop. Brain Res. **76**, 105-113, 1993
95. Joly G. A., Ayres M. and Kilbourn R. G.:
Potent inhibition of inducible nitric oxide synthase by geldanamycin, a tyrosine kinase inhibitor, in endothelial, smooth muscle cells and in rat aorta.
FEBS Lett. **403**, 40-44, 1997
96. Juretic A., Spagnoli G. C., Horig H., Shipman R., Kocher T., Samija M., Turic M., Eljuga D., Harder F. and Heberer M.:
Tyrosine kinase-dependent and -independent events induced by interleukin-2 stimulation: interleukin-2-mediated NO production required for the induction of lymphokine-activated killer cell activity in rat splenocytes is tyrosine kinase independent.
Immunology **85**, 325-330, 1995
97. Kaltenbach J. P., Kaltenbach M. R. and Lyons W. B.:
Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells
Exp. Cell Res. **15**, 112-117, 1958
98. Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S. i., Kimura T., Green S. J. et al.:
Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages.
Science **263**, 1612-1615, 1994

99. Kennedy M. K., Torrance D. S., Picha K. S. and Morhler K. M.:
Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery.
J. Immunol. **149**, 2496-2505, 1992
100. Kiefer R., Lindholm D. and Kreutzberg G. W.:
Interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 mRNAs are induced in the rat facial nucleus following motoneuron axotomy.
Eur. J. Neurosci. Res. **36**, 775-781, 1993
101. Kiess W., Haskell J. F., Lee L., Greenstein L.A., Miller B. E., Aarons A. L., Rechler M. M. and Nissley S. P.:
An antibody that blocks insulin-like growth factor (IGF) binding to the type II IGF receptor is neither an agonist nor an inhibitor of IGF-stimulated biologic responses in L6 myoblasts.
J. Biol. Chem. **262**, 12745-12751, 1987
102. Kishimoto T.:
The biology of interleukin 6.
Blood **74**, 1-10, 1989
103. Kitamura Y., Imaizumi R., Kitayama Y., Esumi H. and Nomura Y.:
Possible involvement of tyrosine kinase activation in lipopolysaccharide-induced expression of Ca(2+)-insensitive but calmodulin-coupling nitric oxide synthase in rat glial cells.
J. Neurosci. Res. **43**, 235-245, 1996
104. Kitchens R. L. and Munford R. S.:
Modulation of protein tyrosine phosphorylation in human cells by LPS and enzymatically deacylated LPS.
Prog. Clin. Biol. Res. **392**, 353-363, 1995
105. Kong L. Y., Lai C., Wilson B. C., Simpson J. N. and Hong J. S.:
Protein tyrosine kinase inhibitors decrease lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in mixed glia, microglia-enriched or astrocyte-enriched cultures.
Neurochem. Int. **30**, 491-497, 1997
106. Kong L. Y., McMillian M. K., Maranpot R. and Hong J. S.:
Protein tyrosine kinase inhibitors suppress the production of nitric oxide in mixed glia, microglia-enriched or astrocyte-enriched cultures.
Brain Res. **729**, 102-109, 1996
107. Korematsu K., Goto S., Nagahiro S. and Ushio Y.:
Microglial response to focal cerebral ischemia: an immunocytochemical study on the rat cerebral cortex using antiphosphotyrosine antibody.
J. Cereb. Blood Flow Metab. **14**, 825-830, 1994

108. Kreisberg R., Detrick M. S. and Moore R. N.:
Opposing Effects of Tumor Necrosis Factor in Lipopolysaccharide-Stimulated Myelopoiesis.
Infection and Immunity **61**, 418-422, 1993
109. Kumon Y., Sakaki S., Kadota O., Matsuda S., Fujita H., Yoshimura H. and Sakanaka M.:
Transient increase in endogenous basic fibroblast growth factor in neurons of ischemic rat brains.
Brain Res. **605**, 169-174, 1993
110. Kuna P., Reddigari S. R., Schall T. J., Rucinski D., Viksman M. Y. and Kaplan A. P.:
RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils.
J.Immunol. **149**, 636-642, 1992
111. Lehtonen A., Matikainen S. and Julkunen I.:
Interferons up-regulate STAT1, STAT2, and IRF family transcription factor gene expression in human peripheral blood mononuclear cells and macrophages.
J. Immunol. **159**, 794-803, 1997
112. Levi-Montalcini R.:
The nerve growth factor 35 years later.
Science **237**, 1154-1162, 1987
113. Levine D. J., Clark R., Devoer M., Helms C., Moskowitz M. A. and Basbaum A. I.:
Interneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis.
Science **226**, 547-549, 1984
114. Li X. M., Finnman U.-B., vEuler G., Hedlund P. B. and Fuxe K.:
Neuromedin N is a potent modulator of dopamine D₂ receptor agonist binding in rat neostriatal membranes.
Neurosci Lett. **155**, 121-124, 1993
115. Lin R. F., Lin T.-S., Tilton R. G. and Cross A. H.:
Nitric oxide localized to spinal cord of mice with experimental allergic encephalomyelitis: An electron paramagnetic resonance study.
J. Exp. Med. **178**, 643-648, 1993
116. Lipton S. A., Singel D. J. and Stamler J. S.:
Nitric oxide in the central nervous system.
Prog. Brain Res. **103**, 359-364, 1994
117. Lobb R. R., Haroer J. W. and Fett J. W.:
Purification of heparin-binding growth factors.
Analytic Biochem. **154**, 1-14, 1986

118. Lotz M., Vaughan J. H. and Carson D. A.:
Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes.
Science **241**, 1218-1221, 1988
119. Louis J. C., Magal E., Takayama S. and Varon S.:
CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death.
Science **259**, 689-692, 1993
120. Luger A., Calogero AE., Kalogeras K., Gallucci WT. et al.:
Interaction of epidermal growth factor with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: potential physiologic relevance.
J. Endocrinol. Metab. **66**, 334-337, 1988
121. Lundberg J. M., Änggard A., Pernow J. and Hökfelt T.:
Neuropeptide Y-, substance P- and VIP-immunoreactive nerves in cat spleen in relation to autonomic vascular and volume control.
Cell Tissue Res. **239**, 9-18, 1985
122. Lundberg J. M., Pernow J., Lacroix S., Franco-Cercle A., Rudehill A. and Hökfelt T.:
Neuropeptide Tyrosine (NPY) and sympathetic cardiovascular control.
Neuropeptide Y, edited by V. Mutt, T. Hökfelt, K. Fuxe and J. Lundberg, 191-199, Raven Press, New York, 1989
123. Lundberg J. M. and Tatemoto K.:
Pancreatic polypeptid family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade.
Acta Physiol. Scand. **116**, 393-402, 1982
124. Lundberg J. M., Tatemoto K., Terenius L., Hellström P. M., Mutt V., Hökfelt T. and Hamberger B.:
Localisation of the polypeptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 4471-4475, 1982
125. MacDonald R. G., Pfeffer S. R., Coussens L., Tepper M. A., Brocklebank C. M., Mole J. E., Anderson J. K., Chen E., Czech M. P. and Ullrich A.:
A single receptor binds both insulin-like growth factor II and insulin-mannose phosphate.
Science **239**, 1134-1136, 1988
126. MacMicking J. D., Willenborg D. O., Weidemann M. J., Rockett K. A. and Cowden W. B.:
Elevated Secretion of Reactive Nitrogen and Oxygen Intermediates by Inflammatory Leukocytes in Hyperacute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Enhancement by the Soluble Products of Encephalitogenic T Cells.
J. Exp. Med. **176**, 303-307, 1992

127. Magal E., Burnham P., Varon S. and Louis J. C.:
Convergent regulation by ciliary neurotrophic factor and dopamine of tyrosine hydroxylase expression in cultures of rat substantia nigra.
Neuroscience **52**, 867-881, 1993
128. Maiese K., Boniece I., DeMeo D. and Wagner J. A.:
Peptide Growth Factors Protect against Ischemia in Culture by Preventing Nitric Oxide Toxicity.
J. Neurosci. **13**, 3034-3040, 1993
129. Marletta M., Yoon P. S., Iyengar R., Leaf C. C. and Wishnok J. S.
Macrophage oxidation of L-Arginin to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.
Biochem. **27**, 8706-8711, 1988
130. Martin F. C., Anton P. A., Gornbein J. A., Shanahan F. and Merrill J. E.:
Production of interleukin-1 by microglia in response to substance P: role for a non-classical NK-1 receptor.
J. Neuroimmun. **42**, 53-60, 1993
131. McKillop I., Haylor J. and el Nahas A. M.:
IGF-I stimulates renal function in the isolated rat kidney: inhibition by aminoguanidine and nitroarginine methylester.
Exp. Nephrol. **3**, 49-57, 1995
132. Merrill J. E., Ignarro L. J., Sherman M. P., Melinek J. and Lane T. E.:
Microglial cell toxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide.
J. Immunol. **151**, 2132-214, 1993
133. Merrill J. E., Murphy S. P., Mitrovic B., MacKenzie-Graham A., Dopp J. C., Ding M., Griscavage J., Ignarro L. J. and Lowenstein C. J.:
Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes.
J. Neurosci. Res. **48**, 372-384, 1997
134. Metcalf D., Hilton D. J. and Nicola N. A.:
Clonal analysis of the actions of the murine leukaemia inhibitory factor on leukaemic and normal murine haematopoietic cells.
Leukemia. **2**, 216-221, 1988
135. Miller D. R., Collier J. M. and Billings R. E.:
Protein tyrosine kinase activity regulates nitric oxide synthase induction in rat hepatocytes.
Am. J. Physiol. **272**, G 207-214, 1997
136. Mitchell H. H., Shonle H. A. and Grindley H. S.:
The origin of the Nitrates in the urine.
J. Biol. Chem., **24**, 461-490, 1916
137. Morgan D. O. and Edelman J. C.:
Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein.
Nature **329**, 301-304, 1987

138. Morrison R. S., Sharma A., De Vellis J and Bradshaw R. A.:
Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 7537-7541, 1986
139. Murphy M., Reid K., Hilton D. J. and Bartlett P. F.:
Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 3498-3501, 1991
140. Murphy S., Simmons M. L., Agullo L., Garcia A., Feinstein D. L., Galea E., Reis D. L., Minc-Golomb and Schwartz J. P.:
Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells.
TINS **16**, 323-328, 1993
141. Nadaud S., Bonnardeaux A., Lathrop M. and Soubrier F.:
Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **198**, 1027-1033, 1994
142. Nakata N., Kato H. and Kogure K.:
Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil.
Brain Res. **605**, 354-356, 1993
143. Nathan C.:
Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?
J. Clin. Invest. **100**, 2417-2423, 1997
144. Nissley P.:
Growth factors.
Principles and practice of endocrinology and metabolism, edited by Kenneth Becker, New York, J. B. Lippincott Company, 1990.
145. Numao T. and Agrawal D. K.:
Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis.
J. Immunol. **149**, 3309-3315, 1992
146. O'Dell T. J., Kandel E. R. and Grant S. G. N.:
Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors.
Nature **353**, 558-560, 1991
147. Oppenheim J. J., Zachariae C. O., Mukaida N. and Matsushima K.:
Properties of the new proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine family.
Annu. Rev. Immunol. **9**, 617, 1991
148. Orlicek S. L., Meals E. and English B. K.:
Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on tumor necrosis factor and nitric oxide production by murine macrophages.
J. Infect. Dis. **174**, 638-642, 1996

149. Otsuka M. and Konishi S.:
Substance P- the first peptide neurotransmitter.
Trends Neurosci. **6**, 317, 1983
150. Pan Z. and Perez-Polo R.:
Role of Nerve Growth Factor in Oxidant Homeostasis: Glutathione Metabolism.
J. Neurochem. **61**, 1713-1721, 1993
151. Patterson S. L., Grady M. S. and Bothwell M.:
Nerve growth factor and a fibroblast growth factor-like neurotrophic activity in
cerebrospinal fluid of brain injured human patients.
Brain Res. **605**, 43-49, 1993
152. Payan D. G., Brewster D. R. and Goetzl E. J.:
Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P.
J. Immunol. **131**, 1613-1615, 1983
153. Pellegrini S. and Schindler C.:
Early events in signalling by interferons.
TIBS **18**, 338-342, 1993
154. Pernow B.:
Substance P.
Pharmacol. Rev. **35**, 85-141, 1983
155. Perry V. H. and Gordon S.:
Macrophages and the Nervous System.
Int. Rev. Cytol. **125**: 203-244, 1991
156. Pine R., Canova A. and Schindler C.:
Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1
promotor to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to
autoregulate the p91 gene.
EMBO J. **13**, 158-167, 1994
157. Rao M. S., Symes A., Malik N., Shoyab M., Fink J. S. and Landis S. C.:
Oncostatin regulates VIP expression in a human neuroblastoma cell line.
NeuroReport **3**, 865-868, 1992
158. Rechler M. M. and Nissley S. P.:
Insulin-like growth factors.
Peptide growth factors and their receptors. Handbook of Pharmacology,
edited by Sporn M. B. and Roberts A. B., Heidelberg: Springer, 1990.
159. Richards C. D., Brown T. J., Shoyab M., Baumann H. and Gauldie J.:
Recombinant Oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins
in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro.
J. Immunol. **148**, 1731-1736, 1992

160. Rinderknecht E. and Humbel R. E.:
Primary structure of human insulin-like growth factor II.
FEBS Lett. **89**, 283-286, 1978
161. Rinderknecht E. and Humbel R. E.:
The aminoacid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin.
J. Biol. Chem. **253**, 2769-2776, 1978
162. Risau W.:
Developing brain produces an angiogenesis factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3855-3859, 1986
163. Rodriguez J., Quignard J.-F., Fagni L., Lafon-Cazal M. and Bockaert J.:
Blockade of Nitric Oxide Synthesis by Tyrosine Kinase Inhibitors in Neurones.
Neuropharmacology **33**, 1267-1274, 1994
164. Romano T. A., Felten N. Y., Felten D. L. and Olschowka J. A.:
Neuropeptide Y innervation of the rat spleen- another potential immunomodulatory neuropeptide.
Brain Behavior Immunity **5**, 116-131, 1991
165. Ruuls S. R., Van Der Linden S., Sontrop K., Huitinga I. and Dijkstra C. D.:
Aggravation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) by administration of nitric oxide (NO) synthase inhibitors.
Clin. Exp. Immunol. **103**, 467-474, 1996
166. Sachs L.:
Angewandte Statistik
Springer Verlag, 7. Auflage, 618-631, 1992
167. Sadowska-Krowicka H., Mannick E. E., Oliver P. D., Sandoval M., Zhang X. J., Eloby-Childress S., Clark D. A. and Miller M. J.:
Genistein and gut inflammation: role of nitric oxide.
Proc. Soc. Biol. Med. **217**, 351-357, 1998
168. Salkowski C. A., Barber S. A., Detore G. R. and Vogel S. N.:
Differential dysregulation of nitric oxide production in macrophages with targeted disruptions in IFN regulatory factor-1 and -2 genes.
J. Immunol. **156**, 3107-3110, 1996
169. Satoh L., Nakamura S., Taga T., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. and Kaziro Y.:
Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor/interleukin 6.
Mol. Cell Biol. **8**, 3546-3549, 1988

170. Saukkonen K., Sande S., Cioffe C., Wolpe S., Sherry B., Cerami A. and Tuomanen E.:
The role of Cytokines in the Generation of Inflammation and Tissue Damage in Experimental Gram-positive Meningitis.
J.Exp. Med. **171**, 439-448, 1990
171. Schall T. J., Bacon K., Camp R. D. R., Kaspari J. W. and Goeddel D. V.:
Human Macrophage Inflammatory Protein α (MIP-1 α) and MIP-1 β Chemokines Attract Distinct Populations of Lymphocytes.
J. Exp. Med. **177**, 1821-1825, 1993
172. Schall T. J., Bacon K., Toy K. J. and Goeddel D. V.:
Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES.
Letters to Nature **347**, 669-671, 1990
173. Schletter J., Heine H., Ulmer A. J. and Rietschel E. T.:
Molecular mechanisms of endotoxin activity.
Arch. Microbiol. **164**, 383-389, 1995
174. Schmidt H. H. and Walter U.:
NO at work.
Cell **78**, 919-925, 1994
175. Schroeder R. A., de la Torre A. and Kuo P. C.:
CD 14-dependent mechanism for endotoxin-mediated nitric oxide synthesis in murine macrophages.
Am. J. Physiol. **273**(3 Pt 1): C 1030-1039, 1997
176. Schultz GS., White M., Mitchell R., Brown G. et al.:
Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor α and vaccinia growth factor.
Science **235**, 350-352, 1987
177. Schumacher M., Jung-Testas I., Robel P. and Baulieu E.-E.:
Insulin-Like Growth Factor I: A Mitogen for rat Schwann Cells in the Presence of Elevated Levels of Cyclic AMP.
Glia **8**: 232-240, 1993
178. Schumann R. R., Pfeil D., Lamping N., Kirschning C., Scherzinger G., Schlag P., Karawajaw L. and Herrmann F.:
Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14.
Blood **87**, 2805-2814, 1996
179. Sendtner M., Schmalbruch H., Stockli K. A., Kreutzberg G. W. and Thoenen H.:
Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuropathy.
Nature **358**, 502-504, 1992

180. Sharf R., Merano D., Azriel A., Thornton A. M., Ozato K., Petricoin E. F., Larner A. C., Schaper F., Hauser H. and Levi B. Z.:
Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA.
J. Biol. Chem. **272**, 9785-9792, 1997
181. Shelton D. L. and Reichardt L. F.:
Studies on the expression of the beta nerve growth factor (NGF) gene in the central nervous system.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2714-2718, 1986
182. Shimojo M., Nakajima K., Takei N., Hamanoue M. and Kohsaka S.:
Production of basic fibroblast growth factor in cultured rat brain microglia.
Neurosci. Lett. **432**, 229-231, 1991
183. Shiraishi A., Dudler J. and Lotz M.:
The role of IFN regulatory factor-1 in synovitis and nitric oxide production.
J. Immunol. **159**, 3549-3554, 1997
184. Shuai K., Schindler C., Prezioso V. R. and Darnell J. E. Jr.:
Activation of transcription by IFN- γ : tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein.
Science **258**, 1808-1812, 1992
185. Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M. and Rogers D.:
Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.
Nature **336**, 688-690, 1988
186. Smith G. D., Harmar A. J., McQueen D. S. and Seckl J. R.:
Increase in substance P and CGRP, but not somatostatin content of innervating dorsal root ganglia in adjuvant monoarthritis in the rat.
Neurosci. Lett. **137**, 257-260, 1992
187. Snyder S. H. and Bredt D. S.:
Biological Roles of Nitric Oxide.
Scientific American **266**, 68-71, 1992
188. Spink J. and Evans T.:
Binding of transcription factor interferon regulatory factor-1 to the inducible nitric-oxide synthase promoter.
J. Biol. Chem. **272**, 24417-24425, 1997
189. Stahl N. and Yancopoulos G.D.:
The Alphas, Betas, and Kinases of Cytokine Receptor Complexes.
Cell **74**, 587-590, 1993

190. Stanley B. G., Daniel D. R., Chin A. S. and Leibowitz S. F.:
Paraventricular injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion.
Peptides **6**, 1205-1211, 1985
191. Stuehr D. J. and Marletta M. A.:
Mammalian nitrite biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7738-7742, 1985
192. Stuehr D. J. and Marletta M. A.:
Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines.
Cancer Res. **47**, 5590-5594, 1987
193. Stuehr D. J. and Nathan C. F.:
Nitric Oxide- a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells.
J. Exp. Med. **169**, 1543-1555, 1989
194. Suda T., O'Garra A., MacNeil I., Fischer M., Bond M. and Zlotnik A.:
Identification of a novel thymocyte growth promoting factor derived from B cell lymphomas.
Cell Immunol. **129**, 228-240, 1990
195. Taga T., Narazaki M., Yasukawa K., Saito T., Miki D., Hamaguchi M., Davis S., Shoyab M., Yancopoulos G. D. and Kishimoto T.:
Functional inhibition of hematopoietic and neurotrophic cytokines by blocking the interleukin 6 signal transducer gp 130.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 10998-11001, 1992
196. Takagi K., Hosaka T. and Suketa Y.
Effect of Recombinant Human IL-6 on Nitrite Production of Mouse Leukemia Cells.
J.Cell.Physiol. **147**, 306-310, 1991
197. Tannenbaum S. R., Moran D., Falchuk K. R., Correa P. and Cuello C.:
Nitrite stability and nitrosation potential in human gastric juice.
Cancer lett. 14(1), 131-136, 1981
198. Tatemoto K.:
Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79**, 2514-2518, 1992
199. Thomas H. E., Dutton R., Bartlett P. F. and Kay T. W.:
Interferon regulatory factor 1 is induced by interferon-gamma equally in neurons and glial cells.
J. Neuroimmunol. **78**, 132-137, 1997

200. Thompson M. A., Cox A. J., Whitehead R. H. and Jonas H. A.:
Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor II: an in-vitro model.
Endocrinol. **126**, 3033-3042, 1990
201. Tillotson M. L. and Wood J. G.:
Phosphotyrosine antibodies specifically label ameboid microglia in vitro and ramified microglia in vivo.
Glia **2**, 412-419, 1989
202. Tsunoda Y., Modlin I. M. and Goldenring J. R.:
Tyrosine kinase activities in the modulation of stimulated parietal cell acid secretion.
Am. J. Physiol. **264**(Gastrointest. Liver Physiol.), G351-G356, 1993
203. Tsutsumi O., Tsutsumi A. and Oka T.:
Epidermal growth factor-like, corneal wound healing substance in mouse tears.
J. Clin. Invest. **81**, 1067-1071, 1988
204. Ulevitch R. J. and Tobias P. S.:
Recognition of endotoxin by cells leading to transmembrane signaling.
Curr. Opin. Immun. **6**, 125-130, 1994
205. Ullrich A., Bergman C. H., Dull T. J., Gray A. and Lee J. M.:
Isolation of the human insulin-like growth factor I receptor gene using a single synthetic DNA probe.
EMBO J. **3**, 361-364, 1984
206. Umezawa K., Hori T., Tajima H., Imoto M., Isshiki K. and Takeuchi T.:
Inhibition of epidermal growth factor-induced DNA synthesis by tyrosine kinase inhibitors.
FEBS Lett. **260**, 198-200, 1990
207. Van Tol E. A. F., Verspaget H. W., Hansen B. E. and Lamers C. B. H. W.:
Neuroenteric peptides affect natural killer activity by intestinal lamina propria mononuclear cells.
J. Neuroimmun. **42**, 139-146, 1993
208. Vanguri P.:
Interferon-gamma-inducible genes in primary glial cells of the central nervous system: comparisons of astrocytes with microglia and Lewis with brown Norway rats.
J. Immunol. **56**, 35-43, 1995
209. Verge V. M. K., Xu Z., Xu X.-J., Wiesenfeld-Hallin Z. and Hökfelt T.:
Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: In situ hybridization and functional studies.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 11617-11621, 1992

210. Villinger P. M., Geng Y. and Lotz M.:
Induction of Cytokine Expression by Leukemia Inhibitory Factor.
J. Clin. Invest. **91**, 1575-1581, 1993
211. Vogel S. N., Manthey C. L., Perera P. Y., Li Z.Y.:
Dissection of LPS-induced signaling pathways in murine macrophages using LPS analogs, LPS mimetics, and agents unrelated to LPS.
Prog. Clin. Biol. Res. **392**, 421-431, 1995
212. Wagner D. A., Young V. R. and Tannenbaum S. R.:
Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of ¹⁵NH₃ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4518-4521, 1983
213. Walike P., Cowan W. M., Ueno N., Baird A. and Guillemin R.:
Fibroblast growth factor promotes survival of dissociated hippocampal neurons and enhances neurite extension.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3012-3016, 1986
214. Watson R. W., Redmond H. P. and Bouchier-Hayes D.:
Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses.
J. Leuk. Biol. **56**, 95-103, 1994
215. Weimann E. und Kiess W.:
Wachstumsfaktoren. Grundlagen, Biochemie und klinische Bedeutung. 1991
216. Weinstein S. L., Gold M. R. and DeFranco A. L.:
Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 4148-4152, 1991
217. Wewetzer K., MacDonald J. R., Collins F. and Unsicker K.:
CNTF rescues motoneurons from ontogenetic cell death in-vivo, but not in-vitro.
Neuroreport **1**, 203-206, 1990
218. Williams E. J., Walsh F. S. and Doherty P.:
Tyrosine Kinase Inhibitors Can Differentially Inhibit Integrin-dependent and CAM-stimulated Neurite Outgrowth.
J. Cell Biol. **124**, 1029-1037, 1994
219. Williams F. G. and Beitz A. J.:
Chronic pain increases brainstem pro-neurotensin/neuromedin-N mRNA expression: a hybridisation-histochemical and immunohistochemical study using three different rat models for chronic nociception.
Brain Res. **611**, 87-102, 1992
220. Williams R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A., Steward C. L., Gearing D. P., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A. and Gough N. M.:
Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.
Nature **336**, 684-687, 1988

221. Wolpe S. D., Sherry B., Jueers D., Davatelis G., Yurt R. W. and Cerami A.:
Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 612, 1989
222. Xie Q.-W., Cho H. J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K. M., Lee T. D.
Ding A., Troso T. and Nathan C.:
Cloning and characterization of inducible Nitric Oxide Synthase from mouse
macrophages.
Science **256**, 225-228, 1992
223. Yamamori T.:
Localisation of cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor mRNA
in the rat brain and peripheral tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 7298-7302, 1991
224. Young S. W., Poole R. C., Hudson A. T., Halestrap A. P., Denton R. M. and
Tavaré J. M.:
Effects of tyrosine kinase inhibitors on protein kinase-independant systems.
FEBS Lett. **316**, 278-282, 1993
225. Zarling J. M., Shoyab M, Marquardt H., Hanson M. B., Lioubin M. N. and
Todaro G. J.:
Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocyte
lymphoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 9739, 1986
226. Zielasek J., Jung S., Gold R., Liew F.Y., Toyka K. V. and Hartung H. P.:
Administration of nitric oxide synthase inhibitors in autoimmune neuritis and
experimental autoimmune encephalomyelitis.
J. Neuroimmunol. **58**, 81-88, 1995
227. Zielasek J., Reichmann H., Künzig H., Jung S., Hartung H. P. and Toyka K. V.:
Inhibition of brain macrophage/microglial respiratory chain enzyme activity in
experimental autoimmune encephalomyelitis of the lewis rat.
Neurosci. Lett. **184**, 129-132, 1995
228. Zielasek J., Tausch M., Toyka K. V. and Hartung H. P.:
Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/ brain macrophages.
Cell Immunol. **141**, 111-120, 1992

7. Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas möchte ich Herrn Professor Dr. med. H.-P. Hartung herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. K. V. Toyka, Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, danke ich für die kritische Durchsicht und das Referat.

Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Prof. Dr. med. G. Stoll

Herrn Prof. Dr. med. H.M. Straßburg möchte ich für die freundliche Übernahme der Zweitprüfung danken.

Herrn Dr. med. J. Zielasek, der diese Arbeit angeregt hat, danke ich ganz besonders für sein Engagement und die hervorragende persönliche Betreuung und Hilfsbereitschaft und die kritische Überarbeitung.

Frau Ines Tschertner (med.-techn. Laborassistentin) möchte ich für die gute Einarbeitung und Hilfe bei vielen Fragestellungen sehr herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank allen Mitarbeitern des neuroimmunologischen Labor der Universität Würzburg für ihr Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft.

Außerdem danke ich Dr. med. Jörg Schröder für seine geduldige Hilfe bei computertechnischen Problemen.

Herrn Dr. med. Jörn Sandstede möchte ich für entscheidende Hilfe bei der Statistik danken.

Schließlich gilt ganz besonderer Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und meine Arbeit mit Interesse verfolgt haben.

8. Lebenslauf

11.03.1968	geboren in Saarbrücken Eltern: Waltraud Müller, geb. Stark, von Beruf Buchhalterin und Horst Müller, Diplom-Ingenieur
1974-1977	Besuch der Grundschule in Saarbrücken-Güdingen
1977-1978	Besuch der Grundschule in Staig bei Ulm
1978-1987	Besuch des Gymnasiums in Ulm-Wiblingen
1987-1988	Freiwilliges Soziales Jahr im Altenpflegeheim Ulm-Wiblingen
1988-1989	Studienaufenthalt in Paris
10/1989	Beginn des Humanmedizinstudiums an der Freien Universität Berlin
9/1991	Physikum
9/1992	1. Staatsexamen
11/1992	Hochschulwechsel an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg
4/1995	2. Staatsexamen
1995-1996	Praktisches Jahr in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik, der Medizinischen Poliklinik und der Chirurgischen Klinik der Universität Würzburg
5/1996	3. Staatsexamen
6/1996-12/1997	Ärztin im Praktikum in der Neurologischen Klinik Bad Neustadt/Saale
seit 12/1997	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik Bad Neustadt/Saale, seit 6/1999 im Erziehungsurlaub nach der Geburt meiner Söhne Timo Philipp und Martin Viktor