

# **Einfluss von Neurotrophinen auf die Entwicklung und Funktion von T- und B-Lymphocyten**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat)



dem Fachbereich für Biologie  
der Philipps Universität Marburg  
vorgelegt von

Dipl. Biol. Berit Sel  
(aus Lüz)

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am 16.07.2007 angenommen.

Erstgutachter: PD Dr. Martin Klingenspor  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Renz (FB Medizin)

Tag der mündlichen Prüfung am 30.07.2007

## Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„Einfluss von Neurotrophinen auf die Entwicklung und Funktion von T- und B-Lymphocyten“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort/Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	V
<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Neurotrophine</b> .....	1
<b>1.2 Neurotrophin-Rezeptoren</b> .....	2
<b>1.3 Neurotrophin-Signalwege</b> .....	5
<b>1.4 Die Rolle der Neurotrophine im Immunsystem</b> .....	7
<b>1.4.1 Expression von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren innerhalb             des Immunsystems</b> .....	8
<b>1.4.2 Effekt von Neurotrophinen auf immunkompetente Zellen</b> .....	12
<b>1.4.3 Einfluss von Neurotrophinen auf immunologische Erkrankungen</b> ...	15
<b>1.5 Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten</b> .....	18
<b>1.6 Entwicklung und Funktion von T-Lymphocyten</b> .....	20
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	25
<b>2.1 Versuchstiere</b> .....	25
<b>2.2 Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels         Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	25
<b>2.2.1 Oligonukleotide zur Amplifikation aus murinen cDNAs:</b> .....	25
<b>2.2.2 Oligonukleotide zur Amplifikation aus humanen cDNAs</b> .....	26
<b>2.3 Antikörper und rekombinante Proteine</b> .....	27
<b>2.4 Chemikalien und Reagenzien</b> .....	27
<b>2.5 Geräte</b> .....	27
<b>2.6 Molekularbiologische Basis-Methoden</b> .....	28
<b>2.6.1 Isolation genomischer DNA</b> .....	28
<b>2.6.2 RNA Isolation</b> .....	28
<b>2.6.3 Fällung von RNA</b> .....	30
<b>2.6.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese</b> .....	30

2.6.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	32
2.6.6 RT-Reaktion .....	32
2.6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	33
2.6.8 Genotypisierung der BDNF <sup>-/-</sup> -Mäuse.....	34
2.7 Herstellung von Gefrierschnitten .....	35
2.8 Herstellung von Cytozentrifugen-Präparaten.....	36
2.9 Immunhistologische Färbung von Oberflächenproteinen .....	36
2.9.1 ABC-Technik.....	36
2.9.2 Immunfluoreszenz.....	38
2.10 Bestimmung der Zellzahl .....	39
2.11 Zellseparationen .....	40
2.11.1 Herstellung einer Zellsuspension aus Maus-Organen.....	40
2.11.2 Präparation mononukleärer Zellen aus der Milz von Mäusen .....	40
2.11.3 Präparation von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut.....	41
2.11.4 Magnetische Zellseparation .....	42
2.12 Stimulation von murinen Splenocyten.....	44
2.12.1 <i>In-vitro</i> Antikörper-Produktion .....	44
2.13 Polyklonale Stimulation von humanen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	44
2.14 Primärkultur von „bone marrow stromal cells“ (BMSCs) .....	47
2.15 „Fluorescence assisted cell sorting“ (FACS)-Messung von Mauszellen.....	47
2.17 Messung der Zellproliferation mittels BrdU-Einbau .....	49
2.18 Apoptose-Messung durch Annexin-V Färbung.....	50
2.19 ELISA .....	51
2.19.1 Immunglobulin-ELISA .....	52
2.19.2 Neurotrophin-ELISA.....	53
2.20 <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA).....	54

2.21 Fluorimetrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration .....	54
2.21.1 Beladung von Zellen mit Fura-2.....	55
2.22.2 Messung von $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fura-2 .....	55
2.23 Daten-Analyse und Statistik .....	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten in der Maus.....	57
3.1.1 Verringerte Zahl von B-Lymphocyten in der Milz von BDNF <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	57
3.1.2 Normale Verteilung von T-Zell-Vorläufern im Thymus von BDNF <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	60
3.1.3 Gestörte B-Zell-Entwicklung in BDNF <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	62
3.1.4 Normale <i>in vitro</i> Antikörper-Produktion von B-Lymphocyten aus BDNF <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	65
3.1.6 Expression der BDNF-Rezeptoren in Milz und Knochenmark.....	66
3.1.7 Expression von BDNF und in Milz und Knochenmark.....	67
3.1.8 Expression von IL-7 in BMSCs von BDNF <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	69
3.1.9 Intrazellulärer Calcium-Einstrom durch BDNF in B-Lymphocyten .....	70
3.2 Funktionelle Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	72
3.2.1 Expression von Neurotrophin-Rezeptoren durch <i>in vitro</i> stimulierte CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	72
3.2.2 Neurotrophin-Produktion durch <i>in vitro</i> stimulierte CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen ....	75
3.2.3 Induktion eines intrazellulären Calcium-Einstroms in T-Lymphocyten durch BDNF .....	76
3.2.4 Veränderte Cytokin-Produktion von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen durch Neurotrophine.....	78
3.2.5 Kein Effekt von Neurotrophinen auf die Proliferation von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	80
3.2.6 Anti-apoptotischer Effekt von Neurotrophinen auf CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen <i>in vitro</i> .....	81

---

<b>4. Diskussion</b> .....	85
<b>4.1 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten in der Maus</b> .....	85
<b>4.2 Funktionelle Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b> .....	92
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	98
<b>6. Literatur</b> .....	100

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BDNF <sup>-/-</sup>	BDNF-defiziente-Mäuse
BMSC	Bone marrow stromal cells
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
β-ME	β-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> )	intrazellulär freie Calcium-Ionen
CA	Kanada
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Differenzierungscluster)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ConA	Concanavalin A
D	Deutschland
DAPI	4'-6 Diamidin-2'-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DTT	1,4 Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elisa	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alii
F(ab) <sub>2</sub>	<i>fragment of antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm

h	Stunde
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
I	Ionomycin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
LPA	<i>lysophosphatic acid</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
min	Minuten
M	Molar
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MNZ	Mononukleäre Zellen
MZ	Mastzelle
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NT	Neurotrophin
NTR	Neurotrophin-Rezeptor
OD	Optische Dichte
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
pH	potentia hydrogenii
PMA	Phorpol 12-myristate 13-acetate
RNA	Ribonukleinsäure

Rnase	Ribonuklease
RPMI	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TH	T-Helfer (Zelle)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Trk	<i>Tropomyosine related tyrosine kinase</i>
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
u	<i>units</i>
ÜN	Über Nacht
% v/v	Prozent auf das Volumen bezogen
WT	Wildtyp
x	mal
ZNS	Zentrales Nervensystem

Weitere Abkürzungen sind in den einzelnen Kapiteln erläutert.

## 1. Einleitung

### 1.1 Neurotrophine

Neurotrophine wurden ursprünglich als Überlebensfaktoren charakterisiert, die von neuronalen Zielzellen produziert werden [Thoenen et al., 19981; Purves et al., 1988, Oppenheim 1991]. Neben ihrer Rolle beim Wachstum, der Entwicklung und der Aufrechterhaltung des zellulären Überlebens sich entwickelnder und maturer neuronaler Zellpopulationen sind inzwischen eine Reihe weiterer Funktionen identifiziert worden, beispielsweise die Regulation der Neuroblasten-Proliferation, die Regulation des Neuriten-Wachstums und die Modulation der synaptischen Funktionen [Huang und Reichardt 2001, 2003; Ip & Yancopoulos 1994].

Neben ihren physiologischen Funktionen spielen Neurotrophine bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen eine Rolle, beispielsweise der Alzheimer Erkrankung [Lindholm et al., 1997; Salehi et al., 2004], beim Morbus Parkinson [Bradford et al., 1999; Nagatsu et al., 2000] oder neuronalen Tumorerkrankungen [Nicolson & Menter 1995; Pomeroy et al., 1997].

Zahlreiche neuere Daten belegen neben den genau untersuchten Effekten der Neurotrophine auf Neuronen, einen weit gefächerten Einfluss von Neurotrophinen außerhalb des Nervensystems, insbesondere auf Zellen des Immunsystems (siehe 1.2). Während sich anfängliche Untersuchungen hauptsächlich mit der Expression von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren durch immunkompetente Zellen beschäftigten, so sind mittlerweile auch zahlreiche direkte Effekte von Neurotrophinen auf Zellen des Immunsystems beschrieben worden und es wird immer deutlicher, dass Neurotrophine wichtige Mediatoren innerhalb physiologischer und pathophysiologischer Immunreaktionen sind.

Der Nervenwachstumsfaktor (*Nerve growth factor*) **NGF** gilt als Prototyp der Neurotrophine und wurde bereits in den 1950er Jahren durch Stanley Cohen und Rita Levi-Montalcini beschrieben [1956]. Neben NGF umfasst die Gruppe der Neurotrophine den *Brain derived neurotrophic factor* (**BDNF**) [Barde et al., 1987], das **Neurotrophin-3** (NT-3) [Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990] und das **Neurotrophin-4/5** (NT-4/5) [Ip et al., 1992; Berkemeier et al., 1991].

Inzwischen wurden zwei weitere Neurotrophine beschrieben, das Neurotrophin-6 und Neurotrophin-7, deren Vorkommen aber bisher nur bei Fischen nachgewiesen wurde [Gotz et al., 1994; Nilsson et al., 1998].

Die Sequenzen der Neurotrophin-Gene sind, mit Ausnahme von NT4-5 innerhalb der Vertebraten hochkonserviert [Ullrich et al., 1983; Isackson et al., 1991]. Interessanterweise wurden Neurotrophine und NT-Rezeptoren kürzlich auch innerhalb der Wirbellosen identifiziert. Dies weist auf eine universelle Rolle der Neurotrophine für die neuronale Entwicklung und Plastizität innerhalb verschiedenster Phyla hin [McKay et al., 1999; Bothwell 2006].

Alle Neurotrophine entstehen zunächst als glykosylierte Neurotrophin-Vorläufer (Pro-Neurotrophine, 31-35kDa), die durch spezifische Konvertasen an hochkonservierten Schnittstellen in mature Neurotrophine (13.2-15.9 kDa) gespalten werden [Chao & Bothwell 2002]. Die maturen Neurotrophine bilden stabile nicht-kovalent gebundene Homodimere [Wiesmann & de Vos 2001].

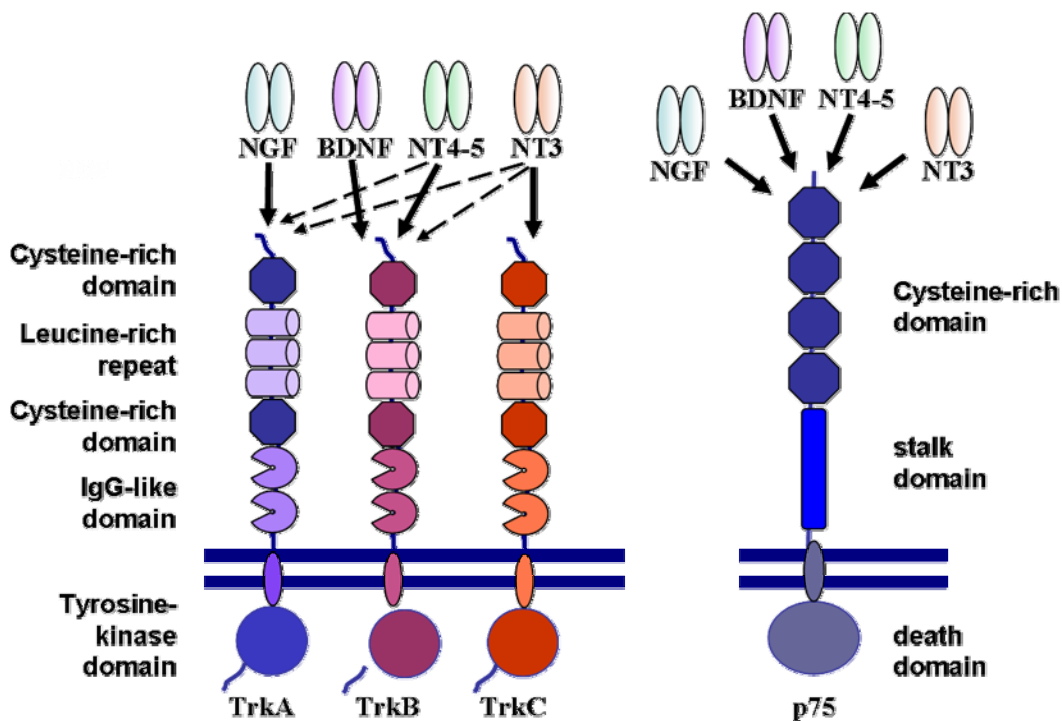
## 1.2 Neurotrophin-Rezeptoren

Die biologischen Effekte der Neurotrophine werden durch ihre Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt (Abb.1.1). Auf zellulärer Ebene sind diese Effekte Zelltyp-spezifisch und teilweise paradox: Neurotrophine können beispielsweise sowohl die zelluläre Proliferation auslösen als auch einen Zellzyklus verhindern; sie können Apoptose abwenden oder auslösen. Diese Komplexität wird durch Bindung der Neurotrophine an ihre Rezeptoren, der Bildung von Rezeptor-Komplexen, alternatives Rezeptor-Splicing sowie durch Interaktionen zwischen den Rezeptoren verursacht [Segal & Greenberg 1996, Friedman & Greene 1999].

Bei den Neurotrophin-Rezeptoren wird zwischen den Tyrosin-Kinase-Rezeptoren: TrkA, TrkB, TrkC [Barbacid 1995; Patapoutian & Reichardt 2001] sowie dem p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) [Roux & Barker 2002; Gentry et al., 2004], einem Mitglied der Fas/CD40/ Tumornekrosefaktor-(TNF)-Rezeptor-Superfamilie unterschieden.

Ein großer Teil der für Neurotrophine beschriebenen Effekte wird durch die **Trk-Rezeptoren** vermittelt. Dies zeigen unter anderem *knock-out* Maus-Modelle, bei denen zielgerichtete Mutationen in einem der Trk-Rezeptor-Gene zu gravierenden Neuropathien und einem frühen neonatalem Tod führt [Minichiello et al., 1995; Pinon et al., 1996, Silos-Santiago et al., 1997].

Bei den Trk-Rezeptoren handelt es sich um circa 140 kDa große Transmembran-Proteine, die aus einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne und fünf extrazellulären Domänen bestehen, von denen die beiden IgG-ähnlichen Domänen für die Liganden-Bindung und Spezifität verantwortlich sind [Ultsch et al., 1999] (Abb.1.1).



**Abbildung 1.1: Modell der Neurotrophin-Bindung an ihre Rezeptoren.** Die Bindung der Neurotrophine an die Trk –Rezeptoren erfolgt Liganden-spezifisch. So bindet NGF ausschließlich an den TrkA-Rezeptor und BDNF an den TrkB-Rezeptor. NT-3 bindet präferenziell an den TrkC-Rezeptor, sowie NT4-5 an TrkB. An den p75-Rezeptor binden alle Neurotrophine mit gleicher Spezifität. Der extrazelluläre Bereich der Trk-Rezeptoren besteht aus zwei Cystein-reichen Domänen, drei Leucin-reichen Motiven und zwei IgG-ähnlichen Domänen. Bei der intrazellulären Domäne handelt es sich um eine Protein-Tyrosin-Kinase. Der pan-Neurotrophin-Rezeptor p75<sup>NTR</sup> besteht aus vier extrazellulären Cystein-reichen Domänen und einer so genannten intrazellulären Todesdomäne (*death domain*).

Die Bindung der Neurotrophine an die Trk-Rezeptoren erfolgt Liganden-spezifisch. So bindet NGF ausschließlich an den TrkA-Rezeptor [Kaplan et al., 1991] und BDNF an den TrkB-Rezeptor [Klein et al., 1991; Soppet et al., 1991]. NT-3 erkennt alle Trk-Rezeptoren mit einer höheren Präferenz für TrkC [Lamballe et al., 1991, Soppet et al., 1991] während NT4-5 präferentiell an TrkB und mit geringerer Affinität an TrkA bindet [Klein et al., 1992] (Abb. 1.1).

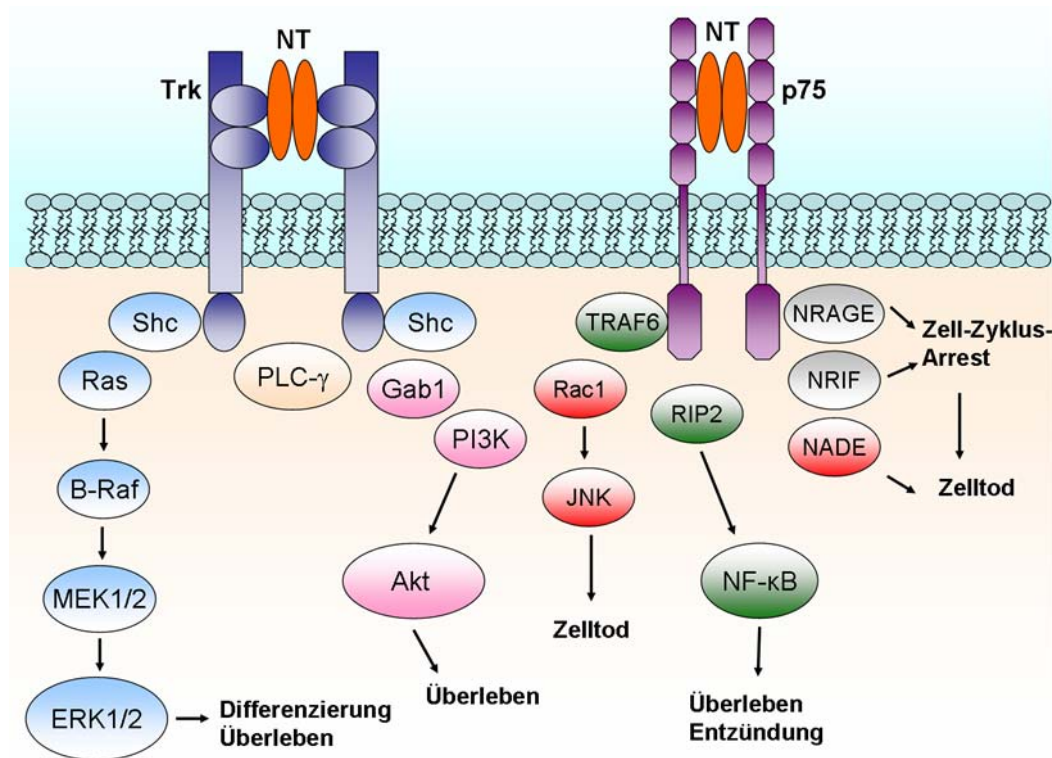
Dagegen binden alle Neurotrophine mit gleicher Spezifität an den **p75-Rezeptor**, den man deshalb auch als pan-Neurotrophin-Rezeptor bezeichnet [Chao 1994]. Neben eigenständigen Signalwegen wirkt der pan-Neurotrophin-Rezeptor p75<sup>NTR</sup> auch als Korezeptor für die Trk-Rezeptoren und erhöht deren Affinität für die entsprechenden Neurotrophine [Chao & Hempstead 1995, Esposito et al., 2001]. Die Proteinstruktur des p75-Rezeptors ist hochkonserviert und umfasst neben extrazellulären Cystein-reichen Domänen [Zampieri & Chao 2004] eine intrazelluläre „Todesdomäne“ [Liepinsh et al., 1997].

Für alle Neurotrophin-Rezeptoren sind alternative Isoformen nachgewiesen worden. Es wurden hierbei sowohl Isoformen beschrieben, deren Bindungsaffinitäten durch alternatives Splicing der extrazellulären Domänen in veränderte Neurotrophin-Affinitäten und somit eine veränderte Spezifität resultieren, als auch Isoformen mit veränderten cytoplasmatischen Domänen [Lamballe et al., 1993; Barbacid 1994]. Diese Varianten weisen defekte oder keine Tyrosinkinase-Domänen auf und sind somit von den herkömmlichen Signalwegen ausgeschlossen [Barbacid 1995].

Interessanterweise kommen diese verkürzten Isoformen, beispielsweise TrkB<sub>gp95</sub>, unter bestimmten Bedingungen in hohen Konzentrationen vor. Die physiologische Rolle dieser Rezeptoren ist noch unklar, möglicherweise wirken sie als inhibitorische Modulatoren des Neurotrophin-Signaling [Eide et al., 1996] oder verhindern eine Neurotrophin-Diffusion. Sogar eigenständige Signalwege [Baxter et al., 1997; Haapasalo et al., 1999] oder ein Wechselwirkung mit p75<sup>NTR</sup> [Hapner et al., 1998] werden diskutiert.

### 1.3 Neurotrophin-Signalwege

Die Neurotrophin-Signaltransduktion durch Trk-Rezeptoren beziehungsweise  $p75^{\text{NTR}}$  verläuft über unabhängige Signalwege, die im Weiteren erläutert werden sollen. In Abbildung 1.2 sind diese Signalwege zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 1.2: Signaltransduktionswege der Trk-Rezeptoren und des  $p75^{\text{NTR}}$ -Rezeptors.** Die Bindung der Neurotrophin-Homodimere führt zur Trk-Rezeptor-Dimerisation, Autophosphorylierung und der Aktivierung verschiedener Signalwege: Ras/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), PLC- $\gamma$ -Signalkaskade (*phospholipase C $\gamma$* ). Trk-Rezeptoren rekrutieren und phosphorylieren das Adaptor-Protein Shc und die PLC- $\gamma$ . Dies führt über die Aktivierung von PI3K und ERK zur Differenzierung beziehungsweise zum Überleben der Zellen. Die  $p75^{\text{NTR}}$ -Signalwege verlaufen hauptsächlich über eine Aktivierung von JNK (Jun N-terminal kinase) und NF $\kappa$ B. Diese Signalwege werden von Adaptorproteinen vermittelt, die an die cytoplasmatische Domäne von  $p75^{\text{NTR}}$  binden, wie NRIF (*neurotrophin-receptor interacting factor*), NADE (*neurotrophin-associated cell death executor*), NRAGE (*neurotrophin-receptor interacting MAGE homologue*), RIP2 (*receptor interacting protein 2*) und TRAF6 (*tumour necrosis factor receptor associated factor 6*). Eine Aktivierung von  $p75^{\text{NTR}}$  kann also sowohl zelluläres Überleben als auch Apoptose auslösen. [Akt: *protein kinase B*, Gab1: *Grb2-associated binder-1*, MEK1-2: *mitogen-activated protein kinase 1-2*]

Die Signalwege, die nach Bindung der Neurotrophine an die **Trk-Rezeptoren** aktiviert werden, sind für die „klassischen“ Neurotrophin-Effekte, wie das Überleben, die Differenzierung und das Wachstum von Neuronen verantwortlich [Patapoutian et al., 2001; Kaplan & Miller 2000].

Hier führt die Bindung der Neurotrophin-Dimere an die Trk-Rezeptoren zur Rezeptor-Dimerisierung [Jing et al., 1992], *trans*-Autophosphorylierung und intrazellulär zur Aktivierung der Ras/ERK- (*extracellular signal-regulated kinase*), PI3K- (*phosphatidylinositol 3-kinase*) oder der PLC- $\gamma$ -Signalkaskade (*phospholipase C $\gamma$* ) [Segal & Greenberg, 1996; Segal 2003; Averalo 2006].

Die Aktivierung der einzelnen Signalwege ist abhängig von spezifischen Adaptor-Proteinen, die mit den aktivierten Trk-Rezeptoren interagieren.

Entscheidend für ein neuronales Überleben ist beispielsweise die Phosphorylierung des Adaptor-Proteins *Shc* [Obermeier et al., 1994], was wiederum zur Aktivierung des Ras/ERK- und PI3K-Signalwegs führt [Atwal et al., 2000].

Der **p75-Rezeptor** erfüllt zwei unterschiedliche physiologische Funktionen. Zum einen moduliert er als Ko-Rezeptor die Signalwege der Trk-Rezeptoren [Hantzopoulos et al., 1994], zum anderen initiiert er eigenständige Signalwege, die sowohl zelluläres Überleben als auch Apoptose regulieren [Rabizadeh et al., 1993; Chao 1994].

Wie alle Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie besitzt p75<sup>NTR</sup> keine intrinsische enzymatische Aktivität. Die Signaltransduktion wird deshalb durch die Bindung von spezifischen Adaptor-Proteinen, den so genannten TRAFs (*TNFR-associated factors*) vermittelt [Krajewska et al., 1998; Ye et al., 1999].

Eine Reihe von weiteren Adaptoren, die bei der p75<sup>NTR</sup>-Signaltransduktion eine Rolle spielen wurden identifiziert und belegen die Aktivierung verschiedener intrazellulärer apoptotischer Signalwege [Bamji et al., 1998]. Zu diesen Effektoren zählen unter anderem RIP2 (*receptor interacting protein 2*) [Khursigara et al., 2001], p53 [Aloyz et al., 1998] sowie Proteasen der Caspase-Familie [Salehi et al., 2002].

Obwohl die Expression von p75<sup>NTR</sup> oft mit der Induktion des Zelltods korreliert, wie vor allem während der Entwicklung sowie nach Verletzungen des ZNS gezeigt wurde, gibt es eine Reihe von Beispielen für anti-apoptotische Effekte [Ryden et al., 1997; Barret & Bartlett 1994]. Diese werden teilweise mit einer Erhöhung der Affinität von Neurotrophinen für die Trk-Rezeptoren begründet, andererseits aber auch durch die Aktivierung von NFκB durch p75<sup>NTR</sup> ausgelöst [Carter et al., 1996, Gentry et al., 2000].

Überraschenderweise wurde nachgewiesen, dass auch die sogenannten Pro-Neurotrophine physiologisch aktiv sind. So zeigte Pro-NGF *in vitro* eine hohe Affinität für den p75-Rezeptor und induzierte eine effektive p75<sup>NTR</sup>-abhängige Apoptose in sympathischen Neuronen [Lee et al., 2001]. Diese Ergebnisse sind auch physiologisch relevant, da im Gehirn Pro-Neurotrophine dominieren und es im Rahmen einer Alzheimer Erkrankung zur Akkumulation von Pro-Neurotrophinen kommt [Fahnestock et al., 2001].

Zahlreiche Komponenten der Neurotrophin-Signalwege wie: ERK, Akt, PLC, PKC, Ras, JNK und NF-κB spielen nicht nur in der Neurotrophin-Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle. Vielmehr wird jede dieser Komponenten auch durch weitere Signalwege, die durch andere Wachstumsfaktoren oder Cytokine induziert werden, aktiviert.

#### **1.4 Die Rolle der Neurotrophine im Immunsystem**

Innerhalb der letzten Dekaden wurde ein verbreiteter Einfluss von Neurotrophinen außerhalb des Nervensystems, insbesondere auf Zellen des Immunsystems, nachgewiesen.

Sowohl primäre (Thymus, Knochenmark) als auch sekundäre lymphatische Organe wie: Lymphknoten, Milz und Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (*mucosa-associated lymphoid tissue* = MALT) werden durch autonome Nervenfasern innerviert sogar Synapsen-ähnliche Kontakte zwischen Nervenfasern und Zellen des Immunsystems wurden postuliert [Felten 1993; Mignini et al., 2003]. In diesem Zusammenhang wird Neurotrophinen die Rolle von Neuromodulatoren zugeschrieben, die gewissermaßen neuronale Signale an Zellen des Immunsystems übermitteln.

Für eine derartige neuromodulatorische Wirkung sprechen eine Reihe von Untersuchungen. Beispielsweise führt intrazerebral injiziertes NGF zur Proliferation von Lymphocyten in der Milz [Sacerdote et al., 1996], während in sympathektomierten Mäusen eine reduzierte T-Zell-Antwort beobachtet wird [Madden et al., 1989; 2000].

Diese NGF-Effekte können hierbei sowohl direkt durch NGF als auch über immunologisch aktive Neurotransmitter, wie „substance“ P oder Neuropeptid Y vermittelt werden [Donnerer et al., 1992]. Neben der neuromodulatorischen Wirkung, bei der Neurotrophine gewissermaßen als Bindeglied zwischen Nerven- und Immunsystem wirken, treten in jüngerer Zeit Mechanismen in den Vordergrund, in denen Neurotrophine sowohl parakrine als auch autokrine Wirkungen auf Zellen des Immunsystems haben. So wurde sowohl eine funktionelle NT-Rezeptor-Expression in zahlreichen immunkompetenten Zellen beschrieben, als auch die Expression von einem oder mehreren Neurotrophine durch diese Zellen.

#### **1.4.1 Expression von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren innerhalb des Immunsystems**

Eine Reihe von Untersuchungen der letzten Jahre belegen ein Vorkommen von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren in immunologischen Geweben, sowohl in Strukturzellen als auch in immunkompetenten Zellen (Tabelle 1.1). Es wurde deutlich, dass die Expression selten konstitutiv erfolgt, sondern vielmehr vom Entwicklungs- beziehungsweise Aktivierungszustand der Zellen abhängt und so einem Regulationsmechanismus unterliegt.

Dadurch lassen sich auch teilweise kontroverse Daten erklären, in denen eine Expression von Neurotrophinen oder NT-Rezeptoren in bestimmten Zellen nicht detektiert werden konnte, während andere Autoren eine deutliche Expression belegen.

Im **Thymus** wurden mRNAs für alle Neurotrophine und NT-Rezeptoren detektiert [Timmusk et al., 1993; Laurenzi et al., 1994; Parrons et al., 1998]. Die Identifikation der Zellen, die sie exprimieren, ist jedoch noch nicht vollständig abgeschlossen.

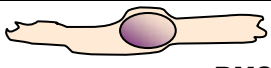








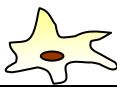
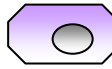
Allerdings deuten die bisherigen Daten darauf hin, dass vor allem Stroma-Zellen des Thymus, wie Epithelzellen [Shibayama & Koizumi 1996; Hannestad et al., 1997], Macrophagen [Garcia-Suárez et al., 1998, 2002] und dendritische Zellen [Labouyrie et al., 1997] NT-Rezeptoren (TrkA, TrkB, p75<sup>NTR</sup>) exprimieren und auch funktionell auf eine NT-Applikation reagieren.

So wurde gezeigt, dass eine NGF-Applikation *in vivo* zur Hypertrophie von Epithelzellen führt [Abramchik et al., 1988] und *in vitro* die IL-6 Transkription erhöht [Screpanti et al., 1992]. Als mögliche lokale Quelle für diesen parakrinen Mechanismus kommen NGF-produzierende T-Zellen des Thymus in Frage [Ehrhard et al., 1993b; Lambiase et al., 1997]. Ein anderes Bild zeichnet sich für die TrkB Expression ab. Hier sind Thymocyten die TrkB-exprimierenden Zellen [Maroder et al., 1996; Besser & Wank 1999; Garcia-Suárez et al., 2002], während eine BDNF Expression für Zellen des Stroma nachgewiesen wurde [Maroder et al., 1996]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der BDNF-Signalweg über den TrkB-Rezeptor für das Überleben bestimmter Thymocyten-Entwicklungsstadien von Bedeutung ist [Maroder et al., 1996].

Auch in der **Milz** wurden alle Neurotrophine auf mRNA-Ebene nachgewiesen [Laurenzi et al., 1994; Yamamoto et al., 1996], wobei bisher nur NT-3 als Protein detektiert wurde [Kato-Semba et al., 1996]. Außerdem konnten sämtliche NT-Rezeptoren auf mRNA-Ebene und zum Teil auch als Protein nachgewiesen werden [Laurenzi et al., 1994; Lomen-Hoerth & Shooter, 1995]. Wie bereits für den Thymus beschrieben, scheinen dendritische Zellen [Labouyrie et al. 1997, Pérez-Pérez et al., 2003] und Macrophagen [Shibayama & Koizumi, 1996] die vorrangig NT-Rezeptor exprimierenden Zellen zu sein.

Innerhalb des **Knochenmarks** sind Stroma-Zellen (*bone marrow stroma cells*, BMSCs) als NT-exprimierende Zellen identifiziert worden. Sowohl die Expression von NGF [Auffray et al., 1996] als auch BDNF und NT-4/5 [Laurenzi et al., 1998] konnte in diesen Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise sind NT-Rezeptoren dagegen bisher vor allem auf hämatopoetischen Vorläufer-Zellen nachgewiesen worden [Chevalier et al, 1994; Labouyrie et al., 1999]. Dies legt die Hypothese nahe, dass Stroma-Zellen des Knochenmarks neben den „klassischen“ Cytokinen auch Neurotrophine als Wachstums-Modulatoren für hämatopoetische Zellen exprimieren.

**Tabelle 1.1 Expression von Neurotrophinen und Neurotrophin-Rezeptoren in Struktur-Zellen und immunkompetenten Zellen des Immunsystems.** Beim dargestellten Vorkommen von Neurotrophinen und NT-Rezeptoren handelt es sich nicht um eine konstitutive Expression, vielmehr ist das Potential der einzelnen Zellen angegeben, diese unter bestimmten Bedingungen zu exprimieren [Tabelle modifiziert nach Vega et al., 2003].

	produzierte Neurotrophine	Rezeptor-Expression
 BMSC	NGF BDNF BT-4/5	TrkB p75 <sup>NTR</sup>
 hämatopoetische Vorläufer-Zellen	-	TrkA p75 <sup>NTR</sup>
 B-Zelle	NGF BDNF NT-3	-
 T-Zelle	NGF BDNF NT-3 NT-4/5	TrkA TrkB
 Monocyt Macrophage	NGF BDNF NT-3 NT-4/5	TrkB TrkC p75 <sup>NTR</sup>
 neutrophiler Granulocyt	NGF BDNF NT-4/5	TrkB
 basophiler Granulocyt	-	TrkA
 eosinophiler Granulocyt	NGF	TrkA TrkB TrkC p75 <sup>NTR</sup>
 basophile Mastzelle	NGF BDNF NT-3	TrkA
 Dendritische Zelle	-	TrkA TrkB TrkC p75 <sup>NTR</sup>
 Epithel-Zelle	NGF BDNF	TrkA TrkC p75 <sup>NTR</sup>

Hinsichtlich der immunkompetenten Zellen ist die Neurotrophin- und NT-Rezeptor-Expression bisher besonders intensiv in Lymphocyten untersucht worden. Interessanterweise ist die Expression hier häufig vom Aktivierungszustand der Zellen abhängig.

So wurde gezeigt, dass eine TrkA- und NGF-Expression in **CD4<sup>+</sup>-T-Zellen** durch eine mitogene Stimulation induziert werden kann [Ehrhard et al., 1993]. Daneben wurde eine differentielle NT-Rezeptor-Expression in unstimulierten TH1-/TH2-Zellen nachgewiesen. Während TH1- und TH2-Zellen TrkA und NGF exprimieren [Lambiase et al., 1997], wurde die vollständige Isoform des TrkB- und TrkC-Rezeptors in TH1-Zellen nachgewiesen [Besser & Wank 1999]. Eine Expression von NGF [Santambrogio et al., 1994], BDNF [Braun et al., 1999; Kerschensteiner et al., 1999], NT-3 und NT-4/5 [Moalem et al., 2000] wurde sowohl in CD4<sup>+</sup>- als auch in **CD8<sup>+</sup>-T-Zellen** gezeigt, wobei die NGF-Expression durch antigene Stimulation in TH2-Zellen erhöht werden konnte [Santambrogio et al., 1994].

Die NT-Rezeptorexpression in **B-Zellen** wird kontrovers diskutiert. Während einige Autoren sowohl TrkA als auch p75<sup>NTR</sup> in B-Zellen nachweisen [Torcia et al., 1996; Brodie et al. 1996], verneinen andere eine Expression dieser Rezeptoren und postulieren stattdessen die Expression von TrkB beziehungsweise TrkC [Schenone et al., 1996; D'Onofrio et al., 2000]. Möglicherweise spielt auch hier der Aktivierungszustand der Zellen eine Rolle. Hinsichtlich der Neurotrophin-Produktion wurden sowohl NGF [Santambrogio et al., 1994; Torcia et al., 1996] als auch BDNF [Kerschensteiner et al., 1999] und NT-3 [Besser & Wank 1999] in B-Zellen nachgewiesen.

Auch **Macrophagen** exprimieren Neurotrophine. Hier wurde die Expression von NGF [Caroleo et al., 2001], BDNF [Braun et al., 1999] und NT-4/5 [Schober et al., 1998] nachgewiesen. Hinsichtlich der Rezeptorexpression wurde in **Monocyten** eine Aktivierungs-induzierte TrkA-Expression gezeigt [Ehrhard et al., 1993]. Eine TrkA-Expression wurde auch in einer Reihe weiterer Zellen der **myeloiden Reihe** gezeigt, wie neutrophilen Granulocyten [Kannan et al., 1991], eosinophilen Granulocyten [Hamada et al., 1996], basophilen Granulocyten [Burgi et al., 1996] und Mastzellen [Tam et al., 1997]. Zum Teil wurde in diesen Zellen auch eine Neurotrophin-Expression belegt.

So exprimieren Granulozyten NGF, BDNF und NT-4/5 [Laurenzi et al., 1998], während für Mastzellen eine NGF- [Leon et al., 1994], BDNF- und NT3-Expression [Tam et al., 1997] nachgewiesen wurde.

#### 1.4.2 Effekt von Neurotrophinen auf immunkompetente Zellen

Im vorangegangenen Abschnitt wurde dargestellt, dass zahlreiche immunkompetente Zellen Neurotrophine und/ oder ihre Rezeptoren exprimieren. Inzwischen sind eine ganze Reihe autokriner und parakriner Wirkungen von Neurotrophinen auf immunkompetente Zellen beschrieben worden. Zu diesen Effekten zählen neben der Modulation von Differenzierung, Proliferation und zellulärem Überleben auch der Einfluss auf die Ausschüttung von Cytokinen oder anderen Mediatoren, sowie chemotaktische Effekte. Im folgenden Abschnitt wird der Einfluss von Neurotrophinen auf die Entwicklung und Funktion verschiedener Immunzellen im Detail dargestellt. Eine Übersicht über die bisher beschriebenen Neurotrophin-Effekte gibt Tabelle 1.2.

Erste Daten über eine Neurotrophin-Wirkung auf die Entwicklung von hämatopoetische Zellen wurden bereits 1988 von Matsuda erhalten, der zeigen konnte, dass NGF *in vitro* die terminale Differenzierung von humanen peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) in eosinophile Granulozyten und basophile Mastzellen auslöst. Andere Studien zeigten, dass NGF in Kombination mit SCF (*stem cell factor*) das Überleben erythroider CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> Vorläuferzellen fördert [Auffray et al., 1996].

Ein derart synergistischer Effekt von NGF auf die Granulopoese wurde auch in Kombination mit anderen Mediatoren, wie GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulation factor*) [Tsuda et al., 1991], M-CSF (*macrophage colony-stimulation factor*) [Chevalier et al., 1994] oder IL-3 [Richard et al., 1992], beobachtet. Diese und weitere Daten belegen eine essentielle Rolle von NGF während der Granulopoese.








Die reduzierte Thymocyten-Dichte im Thymus von TrkA-defizienten Mäusen weist darauf hin, dass NGF auch bei der T-Zell-Entwicklung und Thymus-Organogenese von Bedeutung ist [Garcia-Suarez et al., 2000].

Eine Signaltransduktion über den TrkB-Rezeptor scheint während der T-Zell-Entwicklung ebenfalls wichtig zu sein, da TrkB-defiziente Mäuse eine erhöhte

Apoptose kortikaler Lymphozyten im Thymus aufweisen [Garcia-Suarez et al., 2002].

### Tabelle 1.2 Effekte von Neurotrophinen auf Zellen des Immunsystems

Die Tabelle beinhaltet eine Zusammenfassung der bekannten *in vivo* sowie *in vitro* Effekte von Neurotrophinen auf immun-kompetente Zellen. Die Angabe der Referenzen erfolgt im Text [Tabelle modifiziert nach Vega et al., 2003].

Neurotrophin-Effekt	
 B-Zelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Proliferation, Überleben (NGF)</li> <li>• Antikörper-Synthese (NGF)</li> </ul>
 T-Zelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivierung, Überleben (NGF, BDNF)</li> <li>• Differenzierung, Proliferation (NGF)</li> </ul>
 Monocyt Mastzelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Überleben (NGF)</li> <li>• Cytokin-Produktion (NGF)</li> <li>• Chemotaxis (NGF, NT-3)</li> <li>• erhöhte Phagozytose (NGF)</li> <li>• erhöhte Stickoxid-Sekretion (NT-3)</li> </ul>
 neutrophiler Granulocyt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Überleben (NGF)</li> <li>• Chemotaxis (NGF)</li> <li>• Superoxid-Produktion (NGF)</li> <li>• erhöhte Phagozytose (NGF)</li> </ul>
 basophiler Granulocyt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Aktivierung, Überleben (NGF)</li> <li>• Chemotaxis (NGF)</li> <li>• erhöhte Histamin-Ausschüttung (NGF)</li> </ul>
 eosinophiler Granulocyt	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Überleben (NGF)</li> <li>• Chemotaxis (NGF)</li> <li>• Cytokin-Produktion (NGF)</li> <li>• Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren (NGF)</li> </ul>
 basophile Mastzelle	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung, Proliferation, Überleben (NGF)</li> <li>• Chemotaxis (NGF)</li> <li>• Degranulation, Mediator-Ausschüttung (NGF)</li> </ul>
andere Zellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Zellen (NGF)</li> </ul>

Neben dem beschriebenen Einfluss von NGF auf die Hämatopoese, gibt es eine ganze Reihe von Beispielen für die Wirkung von Neurotrophinen auf periphere immunkompetente Zellen.

So zeigten Untersuchungen an reifen Lymphocyten eine dosis-abhängige proliferative Wirkung von NGF sowohl auf **B-Zellen** als auch auf **T-Zellen** [Ottens et al., 1989; Thorpe & Perez-Polo, 1987].

Für B-Zellen wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass NGF als autokriner Überlebensfaktor für IgA<sup>+</sup>/IgG<sup>+</sup>-Gedächtnis-B-Zellen, nicht jedoch für naive IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>B-Zellen wirkt [Torcia et al., 1996]. Daneben vermittelt NGF die Differenzierung von B-Zellen in Immunglobulin-produzierende Plasma-Zellen [Brodie et al., 1996; Kimata et al., 1991] und stimuliert die Produktion von IgM-, IgA- und IgG4-Antikörpern [Ottens et al., 1989; Kimata et al., 1991]. Eine aktivierende Wirkung von NGF auf PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) belegt auch, die durch NGF induzierte, Oberflächen-Expression des IL-2-Rezeptors [Brodie & Gelfand 1992].

**Mastzellen** (MZ) waren die ersten nicht-neuronalen Zellen, für die eine Neurotrophin-Wirkung nachgewiesen wurde. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Effektor-Zellen, die in verschiedenen peripheren Geweben residieren. Nach Antigen/Allergen-Kontakt führt ihre Degranulation zur Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren [Galli 1997]. Bereits 1977 wurde ein Anstieg der MZ-Anzahl in Ratten nachgewiesen, denen täglich NGF injiziert wurde [Aloe & Levi-Montalcini]. Weitere Belege für eine NGF-Wirkung auf die Entwicklung von Mastzellen lieferten *in vitro* Versuche, bei denen murine hämatopoetische Vorläuferzellen unter dem Einfluss von NGF in MZ differenzierten [Matsuda et al., 1991]. Auch für die Funktion von MZ ist NGF von Bedeutung. Durch Interaktion mit dem TrkA-Rezeptor führt NGF zur Histamin-Ausschüttung [Tam et al., 1997]. Die Tatsache, dass MZ neben TrkA auch NGF produzieren und sekretieren, spricht für eine autokrine NT-Wirkung auf diese Zellen.

Für **Monocyten/Macrophagen** ist *in vitro* eine chemotaktische Wirkung sowohl für NGF als auch für NT-3 nachgewiesen worden [Kobayashi & Mizisin 2001] sowie eine Erhöhung der Stickoxid-Produktion durch NT-3 [Barouch et al., 2001]. Darüber hinaus wirkt NGF anti-apoptotisch auf diese Zellen. So verhindert NGF durch Bindung an TrkA in Monocyten eine, durch UV-Strahlung induzierte, Apoptose der Zellen [la Sala et al., 2000]. Interessanterweise scheinen LPS-stimulierte Macrophagen NGF als autokrinen Überlebensfaktor zu exprimieren.

So führte eine LPS-Stimulation in Macrophagen zu einer erhöhten NGF- und TrkA-Expression, während die Neutralisierung von NGF in den LPS-aktivierten Macrophagen Apoptose induziert. Auch für **eosinophile Granulocyten** ist ein anti-apoptotischer NGF-Effekt nachgewiesen worden [siehe 1.2.3].

Ein weitreichender modulierender Einfluss von NGF ist weiterhin für **neutrophile Granulocyten** nachgewiesen worden. NGF fördert in diesen Zellen einerseits das Wachstum und Überleben der Zellen, andererseits verstärkt NGF die Phagozytose sowie die Super-Oxid Produktion und wirkt chemotaktisch [Boyle et al., 1985; Kannan et al., 1991]. Auch die Funktion von **basophilen Granulocyten** wird durch NGF moduliert. Hier führt eine NGF-Exposition zu einem „Priming“ der Basophilen. Das bedeutet, dass im Anschluss an eine NGF-Exposition, Agonisten die Bildung großer Mengen an C<sub>4</sub> Leukotrienen (LTC<sub>4</sub>) induzieren, die per se keine LTC<sub>4</sub>-Synthese initiieren können [Burgi et al., 1996].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Neurotrophine sowohl die Differenzierung, Proliferation und das Überleben von immunkompetenten Zellen fördern, als auch ähnlich den „klassischen“ Cytokinen grundlegende immunologische Funktionen, wie Chemotaxis, Mediator-Ausschüttung oder Antikörper-Produktion modulieren.

### 1.4.3 Einfluss von Neurotrophinen auf immunologische Erkrankungen

Die wichtige Rolle von Neurotrophinen innerhalb der Physiologie immunkompetenter Zellen wird durch die Assoziation immunologischer Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen oder Allergien, mit veränderten Neurotrophin-Spiegeln unterstrichen. In der überwiegenden Mehrzahl wurde hierbei die Rolle von NGF untersucht, während Daten über andere Neurotrophine sehr begrenzt sind. Die Erklärungsversuche für diese Effekte basieren hauptsächlich auf zwei Hypothesen.

So wird zum einen postuliert, dass Neurotrophine wie Hormone unter verschiedenen Stress-Bedingungen, beispielsweise durch die submandibulären Speicheldrüsen [Aloe et al., 1986] in die Blutbahn abgegeben werden und auf diese Weise über weite Strecken auf Zellen des Immunsystems wirken können. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass der Plasma-Spiegel von NGF

durch Stress [Aloe et al., 1986] oder im Rahmen immunologischer Erkrankungen erhöht ist.

Beispiele hierfür sind die erhöhte Plasma-Konzentration von NGF bei Patienten mit rheumatoider Arthritis [Falcini et al., 1996], Systemischem Lupus Erythematosus [Dicou et al., 1999; Aalto et al., 2002], Multipler Sklerose (MS) [Gold et al., 2003] oder allergischen Erkrankungen (zusammengefasst von Nockher et al., 2006; Nassenstein et al., 2006): wie Atopischer Dermatitis [Toyoda et al., 2002] oder Asthma [Renz 2001]. Auch für BDNF wurden erhöhte Plasma-Spiegel im Rahmen allergischer Erkrankungen nachgewiesen [Braun et al., 1999].

Dieser ausschließlich deskriptiven Hypothese stehen zahlreiche Untersuchungen gegenüber, in denen Effekte einer lokalen Neurotrophin-Expression durch Zellen des Immunsystems auf Neuronen und nicht-neuronale Zellen analysiert wurden. Zu den prominentesten Beispielen gehört hier sicherlich der „neuroprotektive“ Effekt von Neurotrophinen bei inflammatorischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie MS. Interessanterweise zeigte sich, dass autoreaktive T-Zellen neben ihrer „neurodestruktiven“ Wirkung, die durch die Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine (INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ) vermittelt wird, über die Expression von NGF [Tabakman et al., 2004], beziehungsweise BDNF auch „neuroprotektiv“ wirken [Kerschensteiner et al., 1999; Moalem et al., 1999, 2000]. Dieser neuroprotektive Effekt konnte durch die Applikation eines Tyrosin-Kinase-Inhibitors verhindert werden [Moalem et al., 2000]. Für einen direkten Effekt spricht weiterhin die beobachtete Blockade der destruktiven INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Effekte auf kultivierte Motoneurone durch Neurotrophine [Hammarberg et al., 2000].

Auch im Rahmen allergischer Erkrankungen spielt die Modulation der Funktion von Neuronen durch Neurotrophine eine Rolle [Nockher & Renz 2006]. Hier stimulieren, von Epithel- und Immun-Zellen produzierte, Neurotrophine die Synthese der Neuropeptide „*substance P*“ und Neurokinin A und B durch sensorische Neuronen [de Vries et al., 2001, 2006]. Die Ausschüttung der Neuropeptide wiederum führt zur Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen, beispielsweise von Lymphocyten, eosinophilen Granulocyten, Mastzellen und Macrophagen [James & Nijkamp 1999]. Diese Steigerung der

inflammatorischen Prozesse durch die Ausschüttung von Neurotransmittern wird als „neurogene Entzündung“ bezeichnet [Barnes 2001].

In jüngster Zeit zeigte sich immer deutlicher, dass Neurotrophine auch direkt die Funktion von Immunzellen modulieren und dadurch die allergische Reaktion verstärken.

Als Hauptquelle für NGF und BDNF in chronisch entzündeten Lungen wurde erst kürzlich das Bronchial-Epithelium identifiziert. Das durch Bronchial-Epithelzellen produzierte NGF/BDNF führte in Kokultur mit Eosinophilen zu einem gesteigerten Überleben der Zellen [Hahn et al., 2006]. Interessanterweise, konnten Hahn et al. zeigen, dass die Anwesenheit der Eosinophilen für eine Erhöhung der NGF/BDNF Produktion durch die Epithelzellen verantwortlich ist.

Ein weiteres Beispiel für eine derartige wechselseitige Beeinflussung ist die Interaktion von Keratinocyten und Mastzellen in der allergischen Haut. So wurde einerseits gezeigt, dass Keratinocyten der allergischen Haut NGF produzieren [Raychaudhuri & Raychaudhuri 2004]. Andererseits ist bekannt, dass NGF eine chemotaktische Wirkung auf Mastzellen [Sawada et al., 2000] ausübt und somit die beobachtete Einwanderung von Mastzellen in die entzündete Haut verstärken kann. NGF reguliert darüber hinaus auch die Ausschüttung von Mediatoren, wie Histamin in Mastzellen. Ein Teufelskreis innerhalb dieser allergischen Entzündung entsteht hierbei durch die Verstärkung der NGF-Produktion in den Keratinocyten durch das von Mastzellen ausgeschüttete Histamin [Yoshioka et al., 2006].

Diese Beispiele belegen die komplexen biologischen Wirkungen von Neurotrophinen, die weit über ihre ursprüngliche Funktion als neuronale Wachstumsfaktoren hinausgehen. Neben ihrer Wirkung als Bindeglieder zwischen Zellen des Nerven und des Immunsystems, verdeutlichte sich den letzten Jahren ihr modulierender Einfluss im Rahmen immunologischer Erkrankungen.

## 1.5 Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten

B-Lymphocyten entwickeln sich, wie alle hämatopoetischen Zellen, aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen [Abramson et al., 1977; Keller et al., 1985] in der fetalen Leber beziehungsweise nach der Geburt im Knochenmark. Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark von Pro (*progenitor*)-B-Zellen über Pre (*precursor*)-B-Zellen in unreife und reife B-Zellen ist charakterisiert durch die schrittweise Umordnung und Expression der Immunglobulin-Gene der schweren (H-) und der leichten (L)-Ketten [Chen & Alt], der differentiellen Expression von intrazellulären oder Oberflächen-gebundenen Markern [Rolink & Melchers 1993] sowie des Zell-Zyklus-Status. In Abbildung 1.1 sind die verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung mit den entsprechenden Markern zusammengefasst.

	Stammzelle	Frühe Pro-B-Zelle	späte Pro-B-Zelle	große Prä-B-Zelle	kleine Prä-B-Zelle	unreife B-Zelle	reife B-Zelle
<b>H-Ketten-Gene</b>	KB	D-J	V-DJ	VDJ	VDJ	VDJ	VDJ
<b>L-Ketten-Gene</b>	KB	KB	KB	KB	V-J	VJ	VJ
<b>Oberflächen-IG</b>	-	-	-	μ-Kette Prä-BCR	μ-Kette Cytoplasma	IgM	IgM IgD
<b>CD19</b>	-	-	+	+	+	+	+
<b>CD45R</b>	-	+	+	+	+	+	+
<b>CD117</b>	-	+	+	-	-	-	-
<b>CD135</b>	-	+	-	-	-	-	-
<b>CD25</b>	-	-	-	+	+	-	-

**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Entwicklung von B-Zellen (modifiziert nach Rolink et al., 1996).** Neben der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle ist der Status der Umordnung der schweren (H)- und leichten (L)-Ketten der Immunglobulin-Gene angegeben. Abkürzungen werden im Text erläutert.

Die phänotypische Klassifizierung der Entwicklungsstadien von B-Zellen erfolgt über die Analyse der Expression bestimmter Oberflächenantigene, der so genannten CD-Antigene. Das Vorhandensein dieser Antigene kann durch Anfärbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern nachgewiesen werden.

Bei den CD-Antigenen handelt es sich um funktionale Membranproteine, die in der Zellkommunikation, der Adhäsion oder im Metabolismus eine Rolle spielen. Unter einem Differenzierungscluster (*cluster of differentiation*, CD) versteht man Gruppen monoklonaler Antikörper, die das gleiche Zelloberflächenmolekül erkennen. Mit Hilfe der CD-Marker ist es möglich, sowohl lymphocytische Subgruppen als auch die Differenzierung und Entwicklung der einzelnen Gruppen zu charakterisieren [Hardy et al., 1995, Rolink & Melchers 1996]. Die in dieser Arbeit verwendete Einteilung der B-Zell-Stadien basiert auf der Nomenklatur von Mechlens und Rolink (1993,1996).

Das erste Stadium der B-Zell-Entwicklung umfasst die **frühen Pro-B-Zellen** (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>). In diesen Zellen beginnt die Rekombination der Gen-Segmente für die H-Kette. Sie exprimieren somit die spezifischen Elemente der VDJ-Rekombinationsmaschinerie, wie TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) und Rag 1/2 (*recombinase-activating gene*). Nach der D<sub>H</sub>-J<sub>H</sub>-Verknüpfung in den frühen B-Zellen erfolgt in den **späten Pro- Zellen** (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>) die V<sub>H</sub>-D<sub>H</sub>J<sub>H</sub>-Verknüpfung.

Eine erfolgreiche Verknüpfung resultiert in der Expression der so genannten  $\mu$  (H)-Kette als Bestandteil des Prä-B-Zell-Rezeptors (BCR) [Horne et al., 1996] in den **großen/kleinen Prä-B- Zellen** (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup>). Der Prä-B-Zell-Rezeptor enthält neben der  $\mu$  (H)-Kette eine Ersatz-L-Kette. Durch Bindung eines Liganden an den Prä-BCR kommt es zur Proliferation der großen Prä-B-Zellen, die schließlich zu kleinen Prä-B-Zellen differenzieren. In diesen Zellen erfolgt die Umordnung der L-Ketten-Gene.

Sobald diese abgeschlossen ist, exprimieren die Zellen IgM auf ihrer Oberfläche und werden nun als **unreife B-Zellen** (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD25<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>-</sup>) bezeichnet. Die unreifen B-Zellen werden auf Selbst-Toleranz selektiert [Hartley et al., 1993] und wandern in die Peripherie, wo sie zu **reifen B-Zellen** (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD25<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>) differenzieren.

Diese exprimieren neben IgM auch IgD auf ihrer Oberfläche und zirkulieren als so genannte **naive B-Zellen** durch die sekundären Lymphgewebe, bis sie auf ein Antigen treffen und aktiviert werden.

Für die Aktivierung der B-Zellen sind neben der Antigenbindung weitere Signale notwendig, wie der Kontakt mit antigen-spezifischen T-Helfer-Zellen und durch sie synthetisierte Cytokine [Clark et al., 1994; Mond et al., 1995].

Aktiviert B-Zellen proliferieren stark und differenzieren sich in Antikörper-produzierende Plasma-Zellen oder langlebige Gedächtnis-Zellen.

Von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von B-Zellen ist der Zell-Zell-Kontakt der frühen B-Zell-Stadien mit den nicht lymphoiden Stroma-Zellen des Knochenmarks durch Zelladhäsionsmoleküle (*cell-adhesion molecules*, CAMs). Daneben produzieren Stroma-Zellen eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel den Membran-gebundenen Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SDF) der mit einer Oberflächentirosinkinase (*c-kit*, CD117) der Pro-B-Zellen interagiert. Unter den sezernierten Cytokinen ist die Rolle von Interleukin-7 hervorzuheben, welches für die Entwicklung der späten Pro- und der Prä-B-Zellen essentiell ist.

## 1.6 Entwicklung und Funktion von T-Lymphocyten

Die Entwicklung der T-Zellen weist viele Gemeinsamkeiten zur Entwicklung der B-Zellen auf. Wie B-Lymphocyten entwickeln sich T-Zellen aus Stammzellen des Knochenmarks und durchlaufen eine Reihe von Gen-Rekombinationen, um einen funktionellen Antigen-Rezeptor (T-Zell-Rezeptor, TCR) auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Neben der Selektion auf Selbst-Toleranz (negative Selektion) [Nossal et al., 1994] durchlaufen T-Zellen auch eine positive Selektion [Fowlkes & Schweighoffer 1995], da sie im Gegensatz zu B-Zellen nur Antigene erkennen, die ihnen über MHC (*major histocompatibility complex*)-Moleküle präsentiert werden.

T-Zell-Vorläufer wandern aus dem Knochenmark zur Reifung in den Thymus. Im Kortex des Thymus bilden Epithelzellen, Macrophagen und Dendritische-Zellen ein Netzwerk, welches entscheidende Stimuli für die Entwicklung dieser Zellen bereitstellt [Ewijk 1991]. Den frühen T-Vorläuferzellen fehlen die Oberflächenmoleküle, die die reifen T-Zellen definieren.

Das sind der T-Zell-Rezeptor-Komplex (CD3+ T-Zell-Rezeptoren  $\alpha:\beta$  oder  $\gamma:\delta$ ), das CD4- und CD8-Molekül. Aufgrund des Fehlens der CD4- und CD8-Expression werden diese frühen Thymocyten auch als „**doppelt negative**“ Thymocyten (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) bezeichnet. Aus diesen Vorläufer-Zellen entstehen zwei Linien von T-Zellen:  $\alpha:\beta$  und  $\gamma:\delta$  T-Zellen, die unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren aufweisen.

Die Hauptpopulation gehört der  $\alpha:\beta$  T-Zell-Linie an. Zusammen mit dem CD3-Molekül wird im nächsten Entwicklungs-Stadium die bereits rekombinierte  $\beta$ -Kette mit einer invarianten  $\alpha$ -Kette als Prä-T-Zell-Rezeptor exprimiert.

Diese Zellen exprimieren CD4 sowie CD8 und werden als „**doppelt-positiv**“ Thymocyten bezeichnet. Schließlich erfolgt die Rekombination der  $\alpha$ -Kette und die Zellen exprimieren vollständige  $\alpha:\beta$ -T-Zell-Rezeptoren. Mehr als 98 % dieser Thymocyten sterben im Thymus, entweder weil sie T-Zell-Rezeptoren exprimieren, die keine Selbst-MHC-Moleküle erkennen, oder weil sie autoreaktiv sind. Diejenigen doppelt-positiven Thymocyten, deren Rezeptoren Selbst-MHC-Moleküle erkennen, verlieren entweder die CD4- oder CD8-Expression und differenzieren sich somit zu CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen oder CD8<sup>+</sup>-cytotoxischen T-Zellen.

Diese „**einfach positiven**“ T-Zellen, wandern aus dem Thymus in die Peripherie aus [Owen et al., 1999; Anderson et al., 2000; Janeway & Travers, 2001]. Bei den CD4 und CD8 Molekülen handelt es sich um integrale Membranmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie. Sie dienen als Ko-Rezeptoren und dirigieren die T-Zellen gewissermaßen zu verschiedenen Zielzellen.

Cytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) gehen durch das CD8-Molekül eine Wechselwirkung mit MHC-Klasse-I-Molekülen ein, die sich auf jeder Zelle befinden, ein und lösen in ihren Zielzellen einen programmierten Zelltod aus, wenn diese Fremdartigen präsentieren.

T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) hingegen erkennen Antigene nur, wenn sie ihnen von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC, B-Zellen Macrophagen, dendritische Zellen) dargeboten werden. Sie werden dadurch aktiviert und sezernieren Cytokine.

Es werden zwei Subtypen von T-Helferzellen (TH) unterschieden, TH1- sowie TH2-Zellen [Maggi 1998; Romagnani 1995]. Ihre Differenzierung ist abhängig vom vorherrschenden Cytokin-Millieu. TH1-Zellen bilden sich unter Einfluss von IL-12 aus, das von aktivierten Macrophagen oder NK-Zellen bei einer Infektion mit intrazellulären Erregern sezerniert wird. Sie sezernieren überwiegend IFN- $\gamma$ , IL-2 sowie TNF- $\alpha$  und sind entscheidend für eine Makrophagenaktivierung. TH2-Zellen entstehen unter Einfluss von IL-4, das bei extrazellulären Infektionen mit Parasiten oder nach Allergen-Kontakt freigesetzt wird. TH2-Zellen sezernieren überwiegend IL-4, IL-5, IL-10 sowie IL-13 und tragen bei der Primärantwort zur Aktivierung von B-Zellen bei. Von entscheidender Bedeutung ist der Einfluss von TH2-Zellen auf die Pathogenese von Allergien.

### 1.7 Fragestellungen

Untersuchungen der letzten Jahre legten komplexe biologische Funktionen von Neurotrophinen offen, die weit über ihre ursprüngliche Funktion als neuronale Wachstumsfaktoren hinausgehen. Innerhalb des Immunsystems wirken Neurotrophine demnach ähnlich den „klassischen“ Cytokinen, in dem sie sowohl spezifische Funktionen von Immunzellen modulieren, als auch Differenzierung und Überleben von immun-kompetenten Zellen beeinflussen.

Allerdings basieren die bisherigen Erkenntnisse hauptsächlich auf Untersuchungen, die sich fast ausschließlich mit der Funktion von NGF innerhalb des Immunsystems beschäftigten, während die funktionelle Bedeutung von BDNF, NT3 oder NT4-5 weitgehend offen blieb. Zwar ist inzwischen für alle Neurotrophine und Rezeptoren eine vielfältige Expression von den verschiedensten Immunzellen nachgewiesen, jedoch ist häufig nicht geklärt, unter welchen konkreten Bedingungen eine Expression erfolgt, wie diese reguliert wird und welche funktionelle Bedeutung sie hat.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte.

Im **ersten Teil** wurde die Rolle von BDNF auf Entwicklung und Funktion von murinen T- und B-Lymphocyten mit Hilfe eines BDNF-defizienten Mausstamms (BDNF<sup>-/-</sup>) untersucht. Durch eine Immunphänotypisierung von Knochenmark, Thymus sowie Milz mittels Durchfluss-cytometrischer Untersuchungen sollten zunächst folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Gibt es in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse eine verminderte T- oder B-Zell-Lymphopoese?
- Wenn ja: Welche Entwicklungsstadien sind davon betroffen?

Nachdem ein spezifischer Arrest der B-Zell-Entwicklung im Pre-BII-Stadium mit einer Reduktion aller nachfolgenden Entwicklungsstadien nachgewiesen wurde, ergaben sich weitere Fragestellungen:

- Hat der Entwicklungsblock Auswirkungen auf das Vorkommen und die Verteilung von B- und T-Lymphocyten in der Peripherie?
- Zeigen die vorhandenen B-Lymphocyten eine normale Funktionalität (Immunglobulin-Produktion, Antikörper-Synthese)?
- Sind B-Lymphocyten in der Lage, direkt auf BDNF zu reagieren?

Der **zweite Teil** der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle von Neurotrophinen auf die Funktion von humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Innerhalb dieses Abschnittes wurden mit Hilfe von *in vitro* Versuchen, für die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Probanden gereinigt wurden, zunächst folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Welche Neurotrophin-Rezeptoren exprimieren unstimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen?
- Ändert sich die Rezeptor-Expression durch eine Aktivierung der Zellen?

Aufgrund der gewonnenen Daten, die eine Induktion beziehungsweise Verstärkung der Rezeptor-Expression durch eine polyklonale Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachwiesen, ergaben sich weitere Fragestellungen:

- Produzieren stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Neurotrophine?
- Sind T-Lymphocyten in der Lage, direkt auf BDNF zu reagieren?
- Welchen Einfluss haben Neurotrophine auf Proliferation, Cytokin-Produktion oder Apoptose der CD4<sup>+</sup>-Zellen?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

BDNF-defiziente Mäuse (Stamm: B6.129S4-Bdnf<sup>TM<sup>Ja</sup>e</sup>) wurden käuflich von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) erworben. Die Zuchtpaare bestanden aus heterozygoten Mäusen. Lebensfähige BDNF<sup>-/-</sup> Nachkommen waren kleiner, zeigten gravierende neuronale Defizite und überlebten durchschnittlich nur 3 Wochen *post partum* [Ernfors et al., 1994]. BDNF<sup>-/-</sup> Mäuse und gleichaltrige Wildtyp-Mäuse wurden am Tag 17 nach der Geburt analysiert. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 20°C, gleichmäßiger Luftfeuchtigkeit sowie unter Einhaltung eines künstlichen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*.

### 2.2 Oligonukleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Design der Oligonukleotid-Primer erfolgte mit Hilfe des Genom-Browsers *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) sowie der Software *Primer3*, wobei die Primer-Bindestellen derart gewählt wurden, dass sie Exon übergreifend waren.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, D) synthetisiert. Die Gebrauchslösungen der Oligonukleotide wurden auf eine Konzentration von 10 µM mit DNase- und RNase-freiem Wasser eingestellt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Die Oligonukleotid-Sequenzen wurden derart gewählt (außer oIMR), dass das Produkt mindestens eine Exon-Intron-Struktur überspannte, so dass die Amplifikation von genomischer DNA entweder nicht möglich war, oder zu erheblich größeren Produkten führte.

#### 2.2.1 Oligonukleotide zur Amplifikation aus murinen cDNAs:

TrkB<sub>gp145</sub> forward: 5'-AAC CTG CTG GTG AAA ATT GG-3'

TrkB<sub>gp145</sub> reverse: 5'-TGC TTG CCG TAG GTG AAG AT-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 196 bp

TrkB<sub>gp95</sub> forward: 5'-CGA ACC TGC AGA TAC CCA AT-3'

TrkB<sub>gp95</sub> reverse: 5'-TCA TGT GCT TGG AAA CCA AA-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 161 bp

p75<sup>NTR</sup> forward: 5'-TTC TAG GGG TGT CCT TTG GA-3'

p75<sup>NTR</sup> reverse: 5'-TCA CCA CGT CAG AGA ACG TA-3

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 175 bp

BDNF forward: 5'-CAC TGA GCA AAG CCG AAC TT-3'

BDNF reverse: 5'-GGA TGG TCA TCA CTC TTC TCA-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 149 bp

IL-7 forward: 5'-TCA GCA TCG ATG AAT TGG AC-3'

IL-7 reverse: 5'-ACC AGT GTT TGT GTG CCT TG-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 214 bp

beta Actin forward: 5'-TTG GGT ATG GAA TCC TGT GG-3'

beta Actin reverse: 5'-AGT ACT TGC GCT CAG GAG GA-3''

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 213 bp

oIMR132: 5'-GGG AAC TTC CTG ACT AGG GG-3'

oIMR133: 5'-ATG AAA GAA GTA AAC GTC CAC-3'

oIMR134: 5'-CCA GCA GAA AGA GTA GAG GAG-3'

### 2.2.2 Oligonukleotide zur Amplifikation aus humanen cDNAs

TrkA forward: 5'-CTG CTG GCT TGG CTG ATA CT-3'

TrkA reverse: 5'-TCA CGA TGG TGA GGT TTC TC-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 299 bp

TrkB<sub>gp145</sub> forward: 5'-ACA AGT TCC TCA GGG CAC AC-3'

TrkB<sub>gp145</sub> reverse: 5'-CCG ATT TTC ACC AGC AAG TT-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 202 bp

TrkC forward: 5'-AAG GGC AGG ATT CAG GGA AC-3'

TrkC reverse: 5'-GCT TTT GAA GTC CGG TGT AG-3

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 150 bp

p75<sup>NTR</sup> forward: 5'-CCA ACC AGA CCG TGT GTG AG-3'

p75<sup>NTR</sup> reverse: 5'-CCA GTC GTC TCA TCC TGG TA-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 184 bp

beta Actin forward: 5'-AGC ACA GAG CCT CGC CTT T'3

beta Actin reverse: 5'-CGC CCA CAT AGG AAT CCT TC-3'

Produktgröße des amplifizierten cDNA-Fragments: 224 bp

### 2.3 Antikörper und rekombinante Proteine

Alle verwendeten Antikörper sowie rekombinanten Proteine werden gesondert bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

### 2.4 Chemikalien und Reagenzien

Laborchemikalien wurden von den Firmen: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, D), Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG (Heidelberg, D) sowie Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, D) in analytischer Qualität bezogen. Reagenzien für die Zellkultur wurden soweit nicht anders beschrieben von PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D) verwendet. Davon abweichende Substanzen werden gesondert aufgeführt.

### 2.5 Geräte

Brutschrank:	(Heraeus, Berlin, D)
CCD-Kamera:	IMAGO CCD Kamera (Till Photonics)
Cell-Counter:	Casy <sup>®</sup> Model TT (Schärfe Systems, Reutlingen, D)
Cryostat:	Leica CM 1850 (Leica Microsystems, Wetzlar, D)
Cytozentrifuge:	Cytospin 3 (Shandon, Frankfurt, D)
Flowcytometer:	FACSort 4CS-0465 (BD Bioscience, San Diego USA)
Fluoreszenz-	
Mikroskop:	Olympus BX51 (Olympus, Hamburg, D)
Gelkammern:	(Peqlab, Erlangen, D)
Inverse-Mikroskop:	Olympus IX70 (Olympus, Hamburg, D)
Monochromator:	Polychrome II (Till Photonics, Martinsried, D)
Spektralphotometer:	Gene Quant II (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, D)
Thermoblock:	Trio-Thermoblock (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D)
Thermocycler:	Robocycler Gradient 40 (Stratagene GmbH, Heidelberg, D) LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
Transilluminator:	Geldoc 2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D)
Zentrifuge:	Megafuge 1.0R (Heraeus, Osterode, D) Biofuge fresco (Heraeus, Osterode, D)

## 2.6 Molekularbiologische Basis-Methoden

### 2.6.1 Isolation genomischer DNA

Für die Genotypisierung der BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien gereinigt. Die Reinigung der DNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits, der auf der Basis von Silikagel-haltigen Bindsäulen arbeitet.

#### **Kits:**

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D)

#### **Durchführung:**

Den Mäusen wurde ein circa 2 mm langes Stück der Schwanzspitze entfernt. Die Gewebe wurden für circa 15 min bei -70°C inkubiert. Nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K wurden die Proben gemischt und bei 56°C bis zur vollständigen Lyse des Gewebes inkubiert (circa 2 h). Während der Lyse wurde die Probe ebenfalls mehrfach gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz abzentrifugiert, 200 µl AL-Puffer wurde zugegeben und der Inhalt für 15 sec geschüttelt. Anschließend wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden erneut kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (96-100%) wurde erneut gemischt und kurz abzentrifugiert. Die Probe wurde ohne den Rand zu benetzen auf eine QIAamp-Säule pipettiert, die 1 min (bei 6000 x g) zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule wurde durch Zugabe von 500 µl AW1-Puffer und anschließende Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer auf die Säule wurde diese für 3 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert (20000 x g). Die DNA wurde durch Zugabe von 200 µl sterilem Wasser und Zentrifugation bei 6000 x g für 1 min aus der Säule eluiert.

### 2.6.2 RNA Isolation

Durch die zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe im Ribosering ist RNA im Gegensatz zu DNA anfälliger für einen hydrolytischen Abbau, besonders in alkalischen Lösungen oder in Gegenwart von Lewissäuren (z.B. Mg<sup>2+</sup>-Ionen). Darüber hinaus kommen RNA-abbauende RNasen ubiquitär vor, benötigen keine zweiwertigen Metallionen als Kofaktoren und sind äußerst stabil. So können sie nach

Denaturierung wie beispielsweise Autoklavieren schnell wieder renaturieren [Sela et al., 1957]. Diese Eigenschaften machen beim Arbeiten mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen nötig. Das verwendete RNA-Isolierungskit enthält Guanidinthiocyanat [Chirgin et al., 1979], ein starkes Denaturierungsmittel, das Zellen lysiert und zelluläre RNasen effektiv denaturiert. Durch Zugabe von Ethanol werden dann Bedingungen geschaffen, die eine selektive Bindung aller RNA-Moleküle (größer als 200 Nukleotide) an eine Silika-Membran erlauben. Nach mehreren Waschstritten wird die RNA schließlich eluiert.

**Reagenzien und Kits:**

RNeasy® Mini Kit	(Qiagen, Hilden, D)
RNA Sample Loading Buffer	(Sigma, Deisenhofen, D)
peqGOLD High Range RNA-Leiter	(Peqlab, Erlangen, D)
RNase-Free DNase Set	(Qiagen, Hilden, D)
QIAshredder-Säulen	(Qiagen, Hilden, D)

**Durchführung:**

Auf bis zu  $5 \times 10^6$  Zellen wurde 350 µl RLT-Puffer (1 ml RLT+10 µl β-ME) gegeben und die Zellen dadurch lysiert. Bis zur Aufreinigung wurden die Proben bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert, dann für 15-20 min bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Säule gegeben und 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Nach Zugabe von 350 µl 70% Ethanol wurde die Probe auf die RNeasy-Säule überführt, die 15 sec bei 8000 g zentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen, der durch Zentrifugation von 15 sec bei 8000 x g wieder entfernt wurde. Jeweils 10 µl Dnase-I-Stammlösung wurde zu 70 µl RDD Puffer gegeben, durch Schwenken des Röhrchens gemischt und direkt auf die Säule pipettiert. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde durch Zugabe von 350 µl RW1 Puffer wie oben beschrieben gewaschen, der Durchlauf verworfen und die Säule auf ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nun wurde 500 µl RPE Puffer zugeben, für 15 sec bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es wurde erneut 500 µl RPE Puffer zugeben und 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule auf ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nach 1 min Zentrifugation bei maximaler Umdrehung wurde die RNA durch Zugabe von 50 µl

RNase-freiem Wasser in ein RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. Hierfür wurde für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert und der Durchlauf zur Erzielung einer besseren Ausbeute nochmals über die Säule gegeben.

Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels Spektroskopie bestimmt und die RNA in Aliquots à 0,5 µg gefällt und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Integrität (Sichtbarkeit der 18 s und 28 s rRNA-Banden) der isolierten RNA wurden jeweils mindestens 400 ng RNA auf ein RNase-freies Agarose-Gel aufgetragen, und eine Gelelektrophorese wie beschrieben (siehe 2.6.4) allerdings unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

### 2.6.3 Fällung von RNA

#### Lösungen:

3 M Natrium-Acetat-Lösung pH 5,5 (Ambion, Austin, USA)

#### Durchführung:

Je Ansatz erfolgte die Zugabe von 2,5 Volumen absoluten Ethanol und 1/10 Volumen Natrium-Acetat. Nach mindestens 1 stündiger Lagerung bei -80°C erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 x g für 15 min. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet durch Zugabe von 500 µl Ethanol (75 %) gewaschen. Zur Lagerung der RNA wurde diese an dieser Stelle bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde erneut bei 13000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das RNA-Pellet bei RT getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde die RNA abschließend in einem gewünschten Volumen von RNase-freiem Wasser gelöst.

### 2.6.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA Fragmente von 0.5 kb bis 25 kb Länge voneinander zu trennen und anhand ihrer Größe zu identifizieren. DNA- und RNA-Moleküle bewegen sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, da ihre Phosphatgruppen im Rückgrat der Nukleinsäuren ionisiert sind und sie somit als Polykationen vorliegen. Beim verwendeten Gelmaterial, der Agarose, handelt es sich um ein Polysaccharid aus Rotalgen. Agarose wird im 1 X TAE- Puffer durch Aufkochen gelöst und verfestigt sich bei

etwa 45 °C. Durch eine Variation der Agarosekonzentration lassen sich Gele unterschiedlicher Porengrößen herstellen. Zur Detektion der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA- und RNA-Proben wird in der Regel eine Ethidiumbromid-färbung durchgeführt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und emittiert unter UV-Licht eine Fluoreszenz (500 nm bis 590 nm). Dadurch wird der Nukleinsäure-Farbstoffkomplex als rot-orange Bande im Gel sichtbar.

**Lösungen und Reagenzien:**

Agarose: DNA Typing Grade Agarose

(GibcoBRL Life Technologies GmbH, Eggenstein, D)

DNA-Leiter: peqGold Orange 50 bp DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen, D)

Gel Loading Solution: G2526 (Sigma, Deisenhofen, D)

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

2 M Tris-Base

1 M Essigsäure

0.1 M EDTA

Gegebenenfalls wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8.3 eingestellt. Der Puffer wurde vor Gebrauch 1:50 (v/v) verdünnt.

**Durchführung:**

In dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration zwischen 1 % und 2 % verwendet. Für die Herstellung der Gele wurde die Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf circa 60°C in den Gelschlitten gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde jeweils 5 µl Größenmarker in Probenpuffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Das Gel wurde anschließend zur Dokumentation auf einem Transilluminator photographisch festgehalten.

### 2.6.5 Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäurekonzentration einer Lösung lässt sich über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmen. Durch Bestimmung des Quotienten der OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub>, der zwischen 1,8-2 liegen sollte, kann der Reinheitsgrad, d.h. die Abwesenheit von kontaminierenden Proteinen, festgestellt werden. Die DNA- beziehungsweise RNA-Konzentration lässt sich dann nach der folgenden Formel berechnen:  $c [\mu\text{g}/\text{ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$ , wobei V den Verdünnungsfaktor und F den Multiplikationsfaktor darstellt (50 für dsDNA, 40 für RNA). Das Spektrophotometer wurde mit Aqua dest. kalibriert.

### 2.6.6 RT-Reaktion

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-PCR lassen sich hochspezifisch RNA-Transkripte nachweisen, um die Genexpression in Geweben beziehungsweise Kulturzellen über die Synthese von „copy DNA“ (cDNA) zu messen. Gewöhnlich wird die RT-PCR in zwei Schritten durchgeführt. Zuerst wird mit Hilfe der Reversen-Transkriptase eine cDNA-Einzelstrangsynthese durchgeführt. Zur Synthese werden „random-hexamer“(pdN<sub>6</sub>)- oder Oligo(pdT<sub>6</sub>)-Nucleotide verwendet. Im ersten Fall binden die pdN<sub>6</sub>-Oligonucleotide rein zufällig an die Gesamt RNA, während im zweiten Fall pdT<sub>6</sub>-Oligonucleotide nur Bereiche des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der eukaryontischen mRNA (2-4 % der Gesamt-RNA) erkennen und RNA-Moleküle in cDNA umschreiben. Im Anschluss wird eine PCR mit DNA-Fragment-spezifischen Oligonucleotiden durchgeführt, bei der die zuvor gebildete einzelsträngige cDNA als Matrize dient.

#### Reagenzien:

Superscript™ II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	(Invitrogen, Carlsbad, USA)
Random Primer	(Invitrogen)
RnaseOUT™ (Recombinant Ribonuclease Inhibitor)	(Invitrogen)
Deoxynucleotide (dNTP) Mix	(Sigma, Deisenhofen, D)
DNA-free™ Kit	(Ambion, Austin, USA)
DTT (1,4 Dithiothreitol)	(Ambion)
Human Brain Total RNA	(Ambion)

**Durchführung:**

Vor der reversen Transkription wurde die, möglicherweise in den RNA-Proben vorhandene, genomische DNA verdaut. Dazu wurden jeweils 25 µl RNA-Probe (100-500 ng) entsprechend den Angaben des Herstellers mit 2,5 µl 10 x Puffer und 2,5 µl DNase versetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Inaktivierungs-Reagenz wurde 2 min bei RT inkubiert und nach 2 minütiger Zentrifugation bei 13000 x g und 4°C der Überstand mit der RNA abgenommen.

Jeweils 10 µl der Probe wurden in der RT- beziehungsweise Kontroll-Reaktion (-RT) eingesetzt. Nun wurden pro Ansatz 1 µl „random hexamer“-Oligonukleotide und 1 µl eines 10 mM dNTP Gemischs zugegeben und bei 65°C für 5 min inkubiert, anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gebracht und kurz anzentrifugiert.

Es erfolgte die Zugabe von 4 µl 5 x Puffer, 2 µl DTT und 1 µl „RNaseOUT“ rekombinanter Ribonukleaseinhibitor. Nach vorsichtigem Mixen wurde für 10 min bei 25°C und anschließend für 2 min bei 37°C inkubiert. Zu den RT-Proben wurde nun jeweils 1 µl Superscript™RnaseH<sup>-</sup>Reverse-Transkriptase zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde für 50 min bei 37 °C und anschließend für 15 min bei 70 °C inkubiert. Abschließend wurde zu den Proben jeweils 1 µl Rnase H zugefügt, die für 20 min bei 37°C RNA der entstandenen DNA-RNA Hybride abbaut. Die cDNA der RT-Reaktionen wurde 1:10 verdünnt in der PCR eingesetzt.

**2.6.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die selektive Amplifikation doppelsträngiger (ds) DNA-Fragmente ausgehend von dsDNA, beziehungsweise ssDNA, wobei nach einem Denaturierungsschritt zwei synthetische Oligonukleotide an komplementäre Sequenzen der Matrize binden. Ausgehend von den freien 3'Enden der Oligonukleotide hängt dann eine thermostabile Polymerase (zum Beispiel *Taq* DNA Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*) freie Desoxyribonukleotide an den neuen Doppelstrang. Durch das zyklische Wiederholen von Denaturierung, Hybridisieren neuer Oligonukleotide („Annealing“) und Polymerisation erfolgt eine exponentielle Amplifikation des Ausgangsmaterials.

**Kits und Reagenzien:**

REDTag™ ReadyMix™ PCR Reaction Mix (Sigma, Deisenhofen, D)

**Durchführung:**

Der Standardansatz (20 µl Gesamtvolumen) für eine PCR wurde folgendermaßen in ein steriles 0,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben:

10 x REDTag™ ReadyMix™	10 µl
Oligonukleotid ("sense"-Strang)	1 µl
Oligonukleotid ("reverse"-Strang)	1 µl
Wasser	6 µl
cDNA	2 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min 94°C; 30 sec 94°C, 45 sec 58 °C, 30 sec 72 °C für 45 Zyklen; 5 min 72 °C.

**2.6.8 Genotypisierung der BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse**

BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden ursprünglich durch zielgerichtete Mutation („targeted mutation“) des BDNF-Gens hergestellt. Ernfors et al. [1994] hat dazu die ES-Stamm-Zell-Linie J1 mit einem linearisierten 9.5 kb-„replacement“-Vektor elektroporiert. Dieser Vektor enthält eine Neomycin(neo)-Expressions-Kassette (Selektionsmarker) im Exon 5 des *bdnf*-Gens. Nach einer erfolgreichen homologen Rekombination wird das Exon 5 durch die Insertion des Selektionsmarker deletiert, so dass nur noch ein verkürztes Protein aus 49 Aminosäuren produziert werden kann. Der resultierende Maus-Stamm **Bdnf<sup>tmJae</sup>** wurde von uns über „Jackson-Laboratory“ (Bar Harbor, USA) ([www.jax.org](http://www.jax.org)) bezogen. Die Typisierung der Mäuse erfolgte durch eine PCR mit genomischer DNA aus der Schwanzspitze der Mäuse. Die Sequenzen der für die Genotypisierung zu verwendenden Oligonukleotide wurden von „Jackson-Laboratory“ angegeben. Die Oligonukleotide binden an die DNA des neo-Selektionsmarkers (oIMR132) beziehungsweise an Sequenzen des Exon V des BDNF Gens (oIMR133 und oIMR134). Die Amplifikation mit oIMR133 & oIMR134 ergibt beim Wildtyp-Allel ein ~275 bp Produkt, während die Amplifikation mit oIMR132 & oIMR133 beim mutanten Allel ein ~340 bp Produkt ergibt.

**Kits und Reagenzien:**

REDTaq™ DNA Polymerase (Sigma, Deisenhofen, D)

**Durchführung:**

DNA wurde wie beschrieben aus einer Schwanzbiopsie gereinigt. Für einen Standardansatz (20 µl) wurden jeweils 50-150 ng DNA entsprechend dem folgenden Schema in der PCR eingesetzt.

10 x REDTaq™ ReadyMix™	10 µl
oIMR132	1 µl
oIMR133	1 µl
oIMR134	1 µl
Wasser	5 µl
DNA	2 µl

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min 94°C; 30 sec 94°C, 45 sec 55 °C, 30 sec 72 °C für 35 Zyklen; 5 min 72 °C.

Durch Auftrennung von jeweils 17 µl der PCR-Produkte im Agarose-Gel und Analyse der Gele am Transilluminator wurde der Genotyp der Mäuse bestimmt.

**2.7 Herstellung von Gefrierschnitten****Materialien:**

OCT-Substrat:	(Sakura, Zoeterwoude, NL)
Objekträger:	Superfrost (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D)
Objekträgerbeschichtung:	Vectabond™ (Vector Laboratories)

**Durchführung:**

Direkt nach der Entnahme des Gewebes wurde dieses auf Korkplättchen zügig in OCT eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die luftdicht verpackten Organblöcke, wurden bis zum Schneiden bei -80°C gelagert.

Die Gefrierschnitte wurden auf mit „Vectabond“ beschichtete Objektträger aufgebracht, direkt für 10 sec in Aceton fixiert und an der Luft bei RT für 24-48 h getrocknet. Zur Lagerung wurden die Objektträger anschließend in Alufolie gewickelt und bei -20°C gelagert.

## 2.8 Herstellung von Cytozentrifugen-Präparaten

### Materialien

Objektträger: Superfrost (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D)

Vectabond™ (Vector Laboratories)

### Durchführung:

Zur anschließenden immunhistochemischen Färbung wurden Cytozentrifugen-Präparate von gereinigten CD4+-T-Zellen angefertigt. Die hierfür verwendeten Objektträger waren entsprechend den Angaben des Herstellers beschichtet worden (Vectabound). Dafür wurden jeweils 200 µl Zell-Suspension in einer Konzentration von  $1-3 \times 10^5$  Zellen pro ml in die Cytozentrifugenkammer gegeben und für 5 min bei 320 x g zentrifugiert. Die Präparate trockneten 2-18 h bei RT und wurden dann für 10 min in Aceton (4°C) fixiert. Nach kurzem Trocknen an der Luft wurden die Objektträger in Aluminium-Folie gewickelt und bei -80°C gelagert.

## 2.9 Immunhistologische Färbung von Oberflächenproteinen

### 2.9.1 ABC-Technik

Bei der so genannten ABC-Technik werden Antigene zunächst mit einem unmarkierten Primär-Antikörper markiert, an den dann ein biotinylierter Sekundär-Antikörper bindet. Durch die Bindung eines Enzym-gekoppelten Avidins an Biotin kommt es zur irreversiblen Ausbildung eines makromolekularen „Complexes“ (ABC). Eine Substrat-Umsetzung durch das gebundene Enzym führt dann zu Anfärbung des Antigens.

### Antikörper:

#### Primär-Antikörper

CD4: Purified rat anti-mouse CD4 (L3T4) monoclonal antibody, clone:H129.19 (BD PharMingen, San Diego, USA)

CD45R: Purified rat anti-mouse CD45R/B220 (L3T4) monoclonal antibody, clone:RA3-6B2 (BD PharMingen, San Diego, USA)

- TrkA: Purified rabbit anti-TrkA (763, sc-118) polyclonal antibody (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz USA)
- TrkB: Purified rabbit anti-TrkB (794, sc-12) polyclonal antibody (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz USA)
- TrkC: Purified rabbit anti-TrkC (798, sc-117) polyclonal antibody (Santa Cruz, Biotechnology, Inc., Santa Cruz USA)

### **Sekundär-Antikörper:**

- Anti-rat: Biotinylated rabbit anti-rat IgG (H+L) (Vector Laboratories, Burlingame, USA), 1:200 in PBS-Puffer mit 1.5% Serum zur Blockade unspezifischer Bindungen
- Anti-rabbit: Biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (Vector Laboratories), 1:200 in PBS-Puffer mit 1.5% Serum zur Blockade unspezifischer Bindungen

### **Kits und Reagenzien:**

- Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Vector<sup>®</sup> Blue Alkaline Phosphatase Substrat Kit III (Vector Laboratories)
- DAB Substrat Kit (Vector Laboratories)
- Peroxidase Blocking Reagent (Dako Corporation, Carpinteria, USA)
- Levamisole Solution (Vector Laboratories)
- Dako<sup>®</sup> Methylgreen (Dako Corporation)
- Dako<sup>®</sup> Nuklear Fast Red (Dako Corporation)
- VectaMount Mounting Medium (Vector Laboratories)
- Kaninchen-Serum (Vector Laboratories)
- Waschpuffer: PBS pH 7.5 (Biochrom AG, Berlin, D)
- Blockierlösung: PBS-Puffer mit 1,5 % Serum der Spezies aus der der Sekundärantikörper stammt

### **Durchführung:**

(Alle Lösungen wurden tropfenweise, wie in der Anleitung beschrieben, auf den Schnitt aufgetragen, wobei so viele Tropfen verwendet wurden, dass der gesamte Schnitt bedeckt war [etwa 100 µl]. Die Inkubationen erfolgten bei RT in einer Feucht-Kammer, um ein Austrocknen zu vermeiden. Überschüssiger Puffer wurde nach jedem Schritt abgekippt. Sämtliche Waschschriffe erfolgten in Glasküvetten. Direkt vor der Färbung wurden die Schnitte für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und kurz getrocknet. Die Objekte wurden anschließend mit einem Fettstift

umrandet und der Objektträger in Waschpuffer überführt. Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte 10 min in Dako-Blockierlösung inkubiert. Anschließend wurde für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Die Schnitte wurden nun 60 min in Blockierpuffer inkubiert. Nach Abkippen der Blockier-Lösung wurde für 60 min in verdünntem Primärantikörper (anti-CD4/CD45R:0,5-5,0 µg Antikörper /ml, anti-TrkA/TrkB/TrkC 1:200 in PBS mit 1,5 % Serum) inkubiert (oder über Nacht bei 4°C). Nach 2-maligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Schnitte 45 min im verdünnten biotinylierten Antikörper inkubiert. Anschließend wurde 2-mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Nun erfolgte für 30 min eine Inkubation in „Vectastain“ ABC-Reagenz. Nach 2-maligem Waschen für jeweils 5 min in PBS wurden die Schnitte für 2-10 min in Diaminobenzidin (DAB) beziehungsweise 20-30 min in angesetzter Substrat-Lösung (Vector-Blue) im Dunkeln inkubiert. Es wurde 1-mal für jeweils 5 min in Wasser, sowie 2-mal für 5 min in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden ÜN bei 4°C in PBS belassen. Sollte eine Doppelfärbung durchgeführt werden, so wurden alle Schritte nach der Inaktivierung endogener Peroxidasen mit einem weiteren primären Antikörper erneut durchgeführt. Die Schnitte wurden nach Angabe des Herstellers mit Methylgrün gegengefärbt und mit „VectaMount Mounting Medium“ eingedeckt.

## 2.9.2 Immunfluoreszenz

### Antikörper

#### Primär-Antikörper:

NGF: Rabbit anti-NGF polyclonal Antibody

BDNF: Rabbit anti-BDNF polyclonal Antibody

NT3: Rabbit anti-NT3 polyclonal Antibody

Die Antikörper wurden von Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA) bezogen.

#### Sekundär-Antikörper:

Cy<sup>™</sup> 3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Dianova, Hamburg, D)

#### Reagenzien:

Blockierlösung: PBS

1 %BSA

5 % Donkeyserum (Dianova, Hamburg, D)

PBS: (Biochrom AG Berlin, D)  
DAPI: 4'-6 Diamidin-2'-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid  
(Sigma, Deisenhofen, D) (1:25000 in PBS verdünnt)  
Prolong Antifade Kit (Molecular Probes, Eugene, USA)

**Durchführung:**

Stroma-Zellen des Knochenmarks (BMSCs) wurden in Lab-Tek™ Chamber Slides™ (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) wie unter 2.14 beschrieben kultiviert. Dadurch wuchsen die Zellen auf Objektträgern und konnten direkt für eine Immunfärbung verwendet werden. Die Zellen wurden zunächst 3 x für 5 min mit PBS gewaschen; anschließend für 5 min mit 1 % SDS in PBS permeabilisiert und erneut für 3 x für 5 min mit PBS gewaschen. Die Blockade unspezifischer Bindungen erfolgte durch Inkubation in Blockierlösung für 1 h. Nach Abkippen der Blockierlösung wurde für 1 h bei RT mit dem Primär-Antikörper (1:200 in PBS + 1% BSA verdünnt) inkubiert. Es wurde 3 x für 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper (1:50 in PBS 1% BSA verdünnt) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (3 x für 5 min mit PBS) wurden die Zellkerne durch 30 min Inkubation in DAPI-Lösung (DNA-spezifischer Fluoreszenz-Farbstoff) angefärbt. Es wurde erneut 3-mal gewaschen. Nach dem Trocknen bei RT im Dunkeln wurden die Schnitte entsprechend den Angaben des Herstellers mit „VectaMount Mounting Medium“ eingedeckt und dunkel bei 4°C gelagert.

**2.10 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzählung erfolgte mit dem Casy-Cell-Counter. Dieses Gerät ermittelt die Anzahl der Zellen einer Suspension nach dem Prinzip der Pulsflächenanalyse, wobei die Änderung des elektrischen Widerstands beim Durchtritt der Zellen durch eine elektrolytgefüllte Messpore, als Maß für das Volumen der Zellen dient.

**Reagenzien:**

Casy®-Ton Schärfe Systems, Reutlingen, D

**Durchführung:**

Die Zellsuspensionen wurden je nach erwarteter Zellzahl 1:200 bis 1.1000 in einer gerätespezifischen Salzlösung (Casy<sup>®</sup>-Ton) verdünnt und entsprechend den Angaben des Herstellers vermessen. Die Messparameter wurden für die jeweiligen Zelltypen standardisiert.

**2.11 Zellseparationen****2.11.1 Herstellung einer Zellsuspension aus Maus-Organen****Reagenzien und Geräte:**

Zellsieb 100 µm: (BD Falcon, Bedford, USA)  
Insulinspritze: (BD Falcon, Bedford, USA)  
Waschpuffer: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)  
(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
2% FCS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)

**Durchführung:**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die folgenden Schritte wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Thymus und/oder Milz wurden entnommen. Die entnommenen Organe wurden sofort in eine auf Eis stehende Petrischale mit PBS überführt. Die Oberschenkelknochen wurden frei präpariert und das Knochenmark mit 3 ml PBS durch eine Insulinspritze in ein 15 ml-Gefäß gespült. Thymus und Milz wurden mit Hilfe des Stempels einer Insulin-Spritze durch die Maschen des Zellsiebes homogenisiert. Das Sieb wurde mit 2 ml PBS gespült, so dass im Sieb nur weißliches Bindegewebe verblieb. Die Zellsuspension wurde nun circa 10-mal vorsichtig auf dem Boden der Petrischale pipettiert.

**2.11.2 Präparation mononukleärer Zellen aus der Milz von Mäusen**

Eine Zellsuspension aus dem relativ festen Gewebe der Milz enthält neben den Leukocyten auch Strukturzellen und zahlreiche Erythrocyten vorhanden, die über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten abgetrennt werden (siehe auch 2.8.3).

**Reagenzien:**

Lympholyte<sup>®</sup>-M: (Cedarlane, Horny, Kanada)  
Komplett-Medium: RPMI 1640 (1 x) ohne L-Glutamin  
(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
10 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
2 mM L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH)  
1% Penstrep (PAA Laboratories GmbH)  
1% Fungizone (PAA Laboratories GmbH)

**Durchführung:**

Drei ml des Zellhomogenisats, das wie unter 2.8.1 beschrieben hergestellt worden war, wurde auf 3 ml Histopaque geschichtet und bei 1200 x g für 20 min bei 20 °C ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wurde abgenommen und in ein neues 15 ml-Gefäß überführt. Mit Medium wurde auf 10 ml aufgefüllt und 10 µl Lösung zur Zellzählung abgenommen. Die Suspension wurde bei 350 x g für 10 min bei RT zentrifugiert und die abzentrifugierten Zellen in einer Konzentration zwischen  $4 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  in Medium aufgenommen.

**2.11.3 Präparation von mononukleären Zellen aus humanem Vollblut**

Die Isolierung zirkulierender peripherer Lymphocyten ist am einfachsten durch eine Dichtezentrifugation von antikoaguliertem Vollblut über einen „Ficoll-Hypaque“-Gradienten durchzuführen. Hierbei werden sowohl die Erythrocyten (99,9% der Gesamtblutzellen) als auch polymorphkernige Granulocyten (vor allem Neutrophile) von den mononukleären Zellen (Lymphocyten und Monocyten) abgetrennt, wobei sich die mononukleären Zellen als sichtbare Bande an der Phasengrenze sammeln.

**Reagenzien:**

Histopaque<sup>®</sup>-1077 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
Komplett-Medium (siehe 2.8.2)

**Durchführung:**

Das verwendete Blut wurde in gängiger Venenpunktionstechnik von freiwilligen, gesunden und erwachsenen Probanden entnommen. Das Blut wurde in Lithium-

Heparin-Röhrchen aufgenommen und sofort aufgereinigt. Jeweils 3 ml Vollblut wurden vorsichtig auf 3 ml Histopaque (im 15 ml-Tube) geschichtet und für 30 min bei 400 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene Interphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 15-ml-Gefäß überführt. Nach 2-maligem Waschen mit 10 ml Komplett-Medium (Zentrifugation bei 350 g für 10 min) wurden die Proben entsprechend der folgenden Verwendung mit Komplett-Medium verdünnt.

## 2.11.4 Magnetische Zellseparation

### 2.11.4.1 Isolation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus humanem Vollblut

Die Reinigung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus humanem Vollblut erfolgte durch eine positive Isolation mittels immunomagnetischer Dynabeads<sup>®</sup>. Durch einen sogenannten *Detachment*-Schritt am Ende der Reinigung verblieben die Zellen unstimuliert sowie ohne Antikörper an ihrer Oberfläche.

#### Kits und Reagenzien:

Dynal<sup>®</sup> CD4 Positive Isolation Kit (DYNAL Biotech, Oslo, Norwegen)

Dynal<sup>®</sup> MPC-L (DYNAL Biotech)

Waschpuffer: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)  
(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
2% FCS (PAA Laboratories)

Medium: RPMI 1640 (1 x) ohne L-Glutamin (PAA Laboratories)  
1% FCS (PAA Laboratories)

#### Durchführung:

Zunächst wurden mononukleäre Zellen (MNC), wie in 2.8.3 beschrieben gereinigt und in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^7$  Zellen/ml in eiskaltem Waschpuffer aufgenommen. Jeweils 72 µl vorgewaschene CD4-beschichtete „Beads“ wurden zu 1 ml der MNC-Suspension zugegeben. Es wurde 20 min bei 2-8 °C unter gleichmäßigem Schwenken des Ansatzes inkubiert. Durch Einspannen des Proben-Röhrchens in die magnetische Halterung („magnetic particle concentrator“, MCP) für 2-3 min wurden die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sedimentiert und der Überstand abgenommen. Die sedimentierten Zellen wurden 4-5mal mit Waschpuffer

gewaschen und je 1 ml Ausgangsmenge in 100 µl Medium aufgenommen. Zum Entfernen der CD4-beschichtete „Beads“ wurden nun jeweils 10 µl „DETACHaBEADS“ zugegeben und für 60 min bei RT unter gleichmäßigem Schwenken des Ansatzes inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min in den MCP eingespannt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieser Ansatz wurde 2mal mit jeweils 500 µl Medium wiederholt, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erzielen. Die Zellen wurden gewaschen und gemäß den nachfolgenden Verwendungen in Medium /Puffer aufgenommen. Die Reinheit der Präparationen wurde regelmäßig durch FACS-Analyse überprüft und lag in der Regel über 98%.

#### **2.11.4.2 Isolation von CD19<sup>+</sup>-B-Zellen aus Milz und Knochenmark**

Die Reinigung von B-Zellen erfolgte über „MACS CD19 MicroBeads“. An diese super-paramagnetischen Mikrokugeln sind monoklonale Antikörper gegen Maus-CD19-Moleküle konjugiert, durch die eine positive Selektion für CD19 positive B-Zellen erfolgte.

##### **Kits und Reagenzien:**

MACS CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D)

MACS LS<sup>+</sup>-Säule (Miltenyi Biotec)

VarioMACS Separator (Miltenyi Biotec)

Waschpuffer: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)  
(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
0,5 % BSA (Sigma, Deisenhofen, D)  
2 mM EDTA (Sigma)

##### **Durchführung:**

Mononukleäre Zellen wurden wie unter 2.8.2 beschrieben isoliert und jeweils 10<sup>7</sup> Zellen in 80 µl Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 20 µl „MACS CD19 MicroBeads“ pro 10<sup>7</sup> Zellen wurde für 15 min bei 6-8°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe des 10-fachen Volumens Waschpuffer für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die abzentrifugierten Zellen in 500 µl pro 10<sup>8</sup> Zellen resuspendiert. Für die Reinigung von bis zu 10<sup>8</sup> B-Zellen wurden LS<sup>+</sup>-Säulen in den Separator gespannt und mit 3 ml Puffer gespült. Die Zellsuspension wurde zugegeben und die Säule 3-mal mit 3 ml Puffer gewaschen.

Die CD19-positiven B-Zellen waren nun an das Säulenmaterial gebunden, während alle anderen Zellen die Säule passiert hatten. Nach Entfernung der Säule aus dem Separator wurden die B-Zellen mit 5 ml Puffer aus der Säule gespült.

## 2.12 Stimulation von murinen Splenocyten

MNCs wurden wie unter 2.8.2 beschrieben hergestellt, wobei alle Schritte inklusive der Disaggregation der Milz unter aseptischen Bedingungen erfolgten. Die Splenocyten (mononukleäre Zellen der Milz) wurden in Komplett-Medium (siehe 2.8.2) aufgenommen und im Brutschrank bei 37°C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.12.1 *In-vitro* Antikörper-Produktion

#### Reagenzien und Antikörper:

SAC: Pansorbin<sup>®</sup>-Cells (Calbiochem, Bad Soden, D)

Anti-CD40: Purified Hamster Anti-Mouse CD40 Monoclonal Antibody, clone: HM40-3 (BD PharMingen, San Diego, CA)

Komplett-Medium (siehe 2.8.2)

#### Durchführung:

Splenocyten wurden in einer Konzentration von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen /ml aufgenommen und je 100 µl in 96-Loch-Flachboden-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, D) pipettiert. Nach 2- 18 h erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl der in Komplett-Medium gelösten Stimulantien (Endkonzentration von SAC: 1:4000 und von anti-CD40: 1 µg/ml). Die Zellen wurden 5 Tage inkubiert und die Überstände bis zur Bestimmung der Ig-Konzentration bei -20°C gelagert.

## 2.13 Polyklonale Stimulation von humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Da die Anteile der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch für das gleiche Antigen sind, in gesunden Probanden gering sind, ist es schwierig, Antigen-spezifische Immunantworten zu untersuchen. Daher werden funktionelle Aspekte dieser Zellen in der Regel durch Applikation polyklonaler Aktivatoren untersucht. Diese Aktivatoren, beispielsweise anti-CD3-Antikörper oder Lektine, binden an invariante Bereiche des T-Zell Rezeptors und führen so zur Aktivierung aller T-Zell-Klone. Durch Zugabe von Koaktivatoren, wie anti-CD28-Antikörper können diese Reaktionen noch verstärkt werden.

**Reagenzien und Antikörper:**

Anti-CD28: Purified Mouse Anti-human CD28 Monoclonal Antibody, clone: CD28.2  
(BD PharMingen, San Diego, CA)

Anti-CD3: Mouse Anti-human CD3 Monoclonal Antibody, clone CLB-CD3 CLB-T3/4.E  
(Sanquin, Amsterdam, NL)

Komplett-Medium (siehe 2.8.2)

**Durchführung:**

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben (2.8.4.1) aufgereinigt und in einer Konzentration von 1,5-2 x 10<sup>6</sup> Zellen/ ml in Komplettmedium aufgenommen. Für die Stimulation wurde in 48-Loch-Flachboden-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, D) jeweils 50 µl Anti-CD3-Antikörper (100µg/ml verdünnt in Komplettmedium) pipettiert und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Zur Kostimulation wurde jeweils 50 µl Anti-CD28-Antikörper (200 µg/ml verdünnt in Komplettmedium) zugegeben. Pro Well wurden jeweils 400 µl CD4<sup>+</sup>-T-Zellsuspension pipettiert und je nach Anwendung zwischen 1 und 7 Tagen kultiviert.

**2.13.1 Proliferation humaner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in-vitro***

Aktivierung sowie Zellkultur der gereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte wie unter 2.13 beschrieben. Zusätzlich wurden jedoch Neurotrophine beziehungsweise neutralisierende Antikörper eingesetzt, deren Einfluss auf die Zell-Proliferation untersucht werden sollte.

**Rekombinante Proteine:**

Rekombinantes humanes NGF (PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA)

Rekombinantes humanes BDNF (PeproTech)

Rekombinantes humanes NT3 (PeproTech)

**Antikörper:**

Anti-NGF: *Rabbit anti-NGF (IgG Fraction) polyclonal Antibody*  
(Chemicon International, Temecula, USA)

Anti-BDNF: *Rabbit anti-BDNF (IgG Faction) polyclonal Antibody*  
(Chemicon International)

Anti-NT3: *Chicken anti-human NT3 polyclonal Antibody*  
(Promega GmbH, Mannheim, D)

Anti-NT4: *Chicken anti-human NT4 polyclonal Antibody*  
(Promega GmbH)

**Durchführung:**

Zeitgleich mit der Stimulation durch anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern erfolgte die Zugabe von Neurotrophinen beziehungsweise neutralisierenden anti-NT-Antikörpern in folgenden Konzentrationen: NGF (100 ng/ml), BDNF (100 ng/ml), NT3 (100 ng/ml), Anti-NGF: (2,5 µg/ml), Anti-BDNF (2,5 µg/ml) Anti-NT3 (2,5 µg/ml), Anti-NT4 (2,5 µg/ml). Die Zellen wurden 40 Stunden inkubiert, Bromdesoxyuridin (BrdU) wurde zugesetzt und nach weiteren 8 Stunden konnte die Proliferation durch Analyse des BrdU-Einbaus gemessen werden (siehe 2.17).

**2.13.2 Cytokin-Produktion humaner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in-vitro*****Rekombinante Proteine und Antikörper:**

Es wurden Neurotrophine und Antikörper wie unter 2.13.1. aufgeführt verwendet.

**Durchführung:**

Aktivierung sowie Zellkultur der gereinigten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgte wie unter 2.13 beschrieben. Die Zugabe der Neurotrophine beziehungsweise anti-NT-Antikörper erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben. Nach 48 h wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und bis zur Messung der Cytokin-Produktion bei -80°C gelagert.

**2.13.3 Apoptose humaner CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in-vitro*****Rekombinante Proteine und Antikörper:**

Es wurden Neurotrophine und Antikörper wie unter 2.13.1. aufgeführt verwendet.

**Durchführung:**

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben (2.8.4.1) aufgereinigt und in einer Konzentration von  $1,5-2 \times 10^6$  Zellen/ml in Komplettmedium aufgenommen. Für die Stimulation wurde in 96-Loch-Flachboden-Platten (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) jeweils 20 µl Anti-CD3-Antikörper (100µg/ml verdünnt in Komplettmedium) pipettiert und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe der Neurotrophine beziehungsweise Antikörper erfolgte wie unter 2.13.2 beschrieben. Pro Loch wurden jeweils 200 µl CD4<sup>+</sup>-T-Zellsuspension pipettiert und für 6 Tagen kultiviert. Anschließend wurde die Apoptose durch „flow-cytometrische“ Annexin-V-Messung bestimmt.

### 2.14 Primärkultur von „bone marrow stromal cells“ (BMSCs)

#### Reagenzien:

Waschpuffer: Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS)  
(PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
1% FCS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D)  
Komplett-Medium (siehe 2.8.2)

#### Durchführung:

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und Femur sowie Tibia präpariert. Dabei wurden die Knochen kurz unterhalb der Gelenke abgetrennt. Vor der Überführung in sterilen eiskalten Waschpuffer wurden die Knochen und die Pinzette mit Ethanol besprüht. Unter der Sterilbank wurde das Knochenmark mit sterilem eiskaltem FCS mit Hilfe einer Insulinspritze aus dem Knochen in ein steriles 15-ml-Röhrchen gespült. Durch mehrmaliges Aufziehen mit der Insulinspritze wurde homogenisiert. Die Zellen wurden bei 350 x g für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet mit Medium auf  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt. Je Kulturfläche wurden 7 ml Zellsuspension verwendet. Die Zellen wurden ohne Störung 24 h bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Nach einem vollständigen Mediumwechsel wurden die adhärenenten BMSCs bis zur Konfluenz (ca. 7-14 Tage) inkubiert, wobei das Medium alle 2-3 Tage ausgetauscht wurde.

### 2.15 „Fluorescence assisted cell sorting“ (FACS)-Messung von Mauszellen

Mit Hilfe der Durchfluss-Cytometrie („Flow cytometry“) ist es möglich, simultan mehrere physikalische Charakteristika einzelner Partikel, in der Regel Zellen, zu messen und zu analysieren. Zu diesen Eigenschaften gehören die relative Zellgröße, die Granularität beziehungsweise interne Komplexität sowie die relative Fluoreszenzintensität. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich z.B. Lymphocyten von Granulocyten unterscheiden.

Eine Sub-Klassifizierung der einzelnen Leukocyten-Untergruppen erfolgt durch Nachweis spezifischer Oberflächenantigene, den CD-Antigenen. Bei den CD-Antigenen handelt es sich um funktionale Membranproteine, die in der Zellkommunikation, der Adhäsion oder im Metabolismus eine Rolle spielen.

Unter einem Differenzierungscluster („cluster of differentiation“, CD) versteht man Gruppen monoklonaler Antikörper, die das gleiche Zelloberflächenmolekül erkennen. Durch die Analyse des Expressionsmusters der CD-Moleküle ist es möglich, sowohl lymphocytische Subgruppen als auch die Differenzierung und Entwicklung der einzelnen Gruppen zu charakterisieren. Dieses Verfahren wird auch als Immunphäotypisierung bezeichnet.

## Antikörper und Lösungen

### Antikörper gegen Maus-Antigene

Antigen	Herkunft,		Markierung
	Subtyp	Klon	
CD4	Ratte	H129.19	FITC
CD8a	Ratte	53-6.7	PE
CD19	Ratte	1D3	PerCP
CD25	Ratte	3C7	PE
CD45	Ratte	30-F11	APC
CD45R	Ratte	RA-6B2	PerCP
CD117	Ratte	ACK45	PE
CD135	Ratte	A2F10.1	PE
IgM	Ratte	R6-60.2	PE
<b>Isotypkontrollen</b>			
Rat IgG <sub>2a</sub> , κ Monoclonal Immunglobulin			FITC, PE, PerCP
Rat IgG <sub>2b</sub> , κ Monoclonal Immunglobulin			PE, APC

### Antikörper gegen humane Antigene

Antigen	Herkunft,		Markierung
	Subtyp	Klon	
Simultest CD3/CD4 Reagenz (Becton Dickinson, San Jose, USA)			
CD3	Maus	SK7	FITC
CD4	Maus	SK3	PE
<b>Isotypkontrollen</b>			
Simultest Control $\gamma_1/\gamma_{2a}$ Reagenz (Becton Dickinson, San Jose, USA)			

Alle Antikörper und Isotypkontrollen wurden von BD PharMingen (San Diego, USA) bezogen.

Waschpuffer: PBS (2% FCS)

Fixierlösung: CellFix (BD PharMingen ,San Diego, USA)

### **Durchführung:**

In FACS-Röhrchen wurden 10 µl Waschpuffer vorgelegt. Pro Ansatz wurden jeweils 0,5 µl der jeweiligen Antikörper dazu pipettiert, wobei bei Verwendung von FITC-(Fluoreszein Isothiocyanat), PE-(Phycoerythrin), PerCP-(Peridinin Chlorophyll Protein), sowie APC (Allophycocyanin)-konjugierten Antikörpern bis zu 4 Oberflächenproteine gleichzeitig angefärbt werden konnten. Anschließend wurden jeweils 100 µl Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml, beziehungsweise 100 µl Vollblut in die entsprechenden Röhrchen gegeben. Es wurde vorsichtig gevortext und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Lyse-Lösung wurde geschüttelt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 250 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml eiskaltem Waschpuffer resuspendiert und die Zellen durch Zentrifugation bei gleichen Bedingungen erneut sedimentiert. Die abzentrifugierten Zellen wurde in 350 µl Fixierlösung durch vorsichtiges Schütteln („Vortex“-Stufe 3) aufgenommen und die Ansätze im Kühlschrank aufbewahrt. Die FACS-Analyse wurde innerhalb von 24 h durchgeführt.

Die Messung erfolgte am „FACscan“ (BD Bioscience). Die Daten wurden mit Hilfe der Cell-Quest-Software als korrelierte Zweiparameterdarstellungen (Dot Plot) aufgetragen und ausgewertet. Die Korrektur unspezifischer Antikörper-Bindungen erfolgte durch Färbung der Zellen mit Isotypkontrollen.

### **2.17 Messung der Zellproliferation mittels BrdU-Einbau**

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Uridin-Derivat, das anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut werden kann. Proliferierende Zellen bauen während der „S“-Phase des Zell-Zyklus im Medium vorhandenes BrdU in die DNA ein und können anschließend durch Zugabe von Fluoreszenz-markierten anti-BrdU Antikörpern mittels Durchfluss-Cytometrie detektiert werden.

### **Reagenzien und Lösungen:**

BrdU	(Sigma, Deisenhofen, D)
FastImmune™ Anti-BrdU FITC with DNase	(BD Bioscience, San Diego USA)
FACS Permeabilizing Solution 2	(BD Bioscience)

EDTA-Lösung (20 mM)	(Sigma)
FACS-Lyse™	(BD Bioscience)
Cell-Fix™	(BD Bioscience)
Waschpuffer:	PBS (Biochrom AG, Berlin, D)
	1 % BSA
	0.2 % Natrium-Acid

### **Durchführung:**

Pro Ansatz wurden 500 µl Zellen in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml in 48-Loch-Flachboden-Platten (Greiner GmbH, Frickenhausen, D) pipettiert und unter den gewünschten Bedingungen inkubiert. Etwa 8 h vor Ende der Zell-Stimulation erfolgte die Zugabe von BrdU in einer Endkonzentration von 60 µM. Die Zellsuspension wurde in 5 ml-Polystyrol-Röhrchen (BD Falcon, Bedford, USA) überführt und mit 10 µl EDTA-Lösung versetzt. Die Ansätze wurden für 15 sec gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 ml kaltes PBS zugegeben, geschüttelt und 10 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die sedimentierten Zellen wurden in 100µl PBS aufgenommen. Nach Zugabe von 2 ml „Facs-Lyse™“-Lösung wurde gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut 10 min bei 500 x g abzentrifugiert und in 100 µl Waschpuffer aufgenommen. Pro Ansatz wurden 500µl FACS-Permeabilisier-Lösung-2 zugegeben und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von 3 ml Waschpuffer 10 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden mit jeweils 20 µl anti BrdU-FITC/Dnase versetzt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml Waschpuffer wurde für 10 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Proben wurden in 300 µl Cell-Fix™ aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln bis zu 24 h gelagert.

### **2.18 Apoptose-Messung durch Annexin-V Färbung**

Als Apoptose bezeichnet man einen programmierten Zelltod, der durch eine Reihe morphologischer Besonderheiten, wie Verlust von Membransymmetrie, Schrumpfen der Zellen, Chromatin-Kondensation sowie DNA-Fragmentierung gekennzeichnet ist. Veränderungen in der Plasmamembran gehören zu den frühesten Veränderungen in apoptotischen Zellen.

Charakteristisch ist die Translokation des membranständigen Phospholipids Phosphatidylserine (PS) von der inneren an die äußere Plasmamembran, wobei PS extrazellulär exponiert wird. Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit hoher Affinität zu PS. Durch Verwendung von Fluorochrom-konjugiertem Annexin-V (beispielsweise Annexin-V-FITC) ist eine Durchfluss-cytometrische Detektion von apoptotischen Zellen relativ einfach möglich.

Zur Unterscheidung von toten und apoptotischen Zellen werden die Zellen simultan mit 7-AAD (7-amino-Actinomycin D) gefärbt, einem Vitalitätsfarbstoff, der von lebenden Zellen aktiv aus dem Cytoplasma entfernt wird.

#### **Kits und Lösungen:**

Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Bioscience, San Diego USA)

7-AAD (7-amino-Actinomycin D) (BD Bioscience)

PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA, Laboratories GmbH (Cölbe, D))

#### **Durchführung:**

$\text{CD4}^+$ -T-Zellen wurden wie beschrieben aufgereinigt (siehe 2.8.4) und stimuliert (siehe 2.13). Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen in ein 5 ml-Rundbodenröhrchen (BD Falcon, Bedford, USA) pipettiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von jeweils 5  $\mu\text{l}$  Annexin V und 5  $\mu\text{l}$  7-AAD wurden die Proben vorsichtig gemischt und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer wurden die Proben innerhalb einer Stunde Durchfluss-cytometrisch gemessen.

Als Kontrolle wurden ungefärbte sowie nur 7-AAD beziehungsweise nur Annexin-V-FITC gefärbte Zellen verwendet.

### **2.19 ELISA**

Ein ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) ist ein serologischer Test, bei dem Antikörper-gebundene Antigene oder Antikörper nach Farbumsatz einer zunächst farblosen Lösung durch ein gekoppeltes Enzym nachgewiesen werden. Der verwendete hoch-spezifische „Sandwich“-ELISA nutzt zum Nachweis von Proteinen an eine Oberfläche gekoppelte Antikörper („Capture“), der Nachweis der gebundenen Proteine erfolgt dann durch Verwendung eines zweiten Antikörper („Detection“).

Durch die Erstellung einer Standardkurve mithilfe eines in definierten Konzentrationen eingesetzten Standards (Antigen) ist es möglich, die Konzentration der vermessenen Proben in ng/ml zu bestimmen.

### 2.19.1 Immunglobulin-ELISA

#### Reagenzien und Lösungen:

“Coating”-Bicarbonat Puffer:	1,59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 2,93 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,20 g NaN <sub>3</sub> pH auf 9,6 einstellen
PBS:	PBS ohne Calcium und Magnesium (PAA, LaboratoriesGmbH (Cölbe, D))
Blockier-Puffer:	PBS (3 % BSA)
Waschpuffer:	PBS (0.03 % Tween-20)
Verdünnungs-Puffer:	PBS (0.3 % BSA)
Streptavidin-Peroxidase:	1: 1000 in PBS 0.1 % BSA (Sigma, Deisenhofen, D)
POD-Substrat:	BM blue (Roche Diagnostics, Mannheim, D))
Stopp-Lösung:	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 M)

#### Antikörper

Immunglobulin	Capture AK	Standard	Detection AK
gesamt IgG1	<i>purified rat anti-mouse IgG1 monoclonal antibody</i>  Clone: A 85-3 (BD Bioscience)	<i>purified mouse monoclonal Immunglobulin Isotyp standard (IgG<sub>1</sub>,λ)</i>  Clone: S <sub>1</sub> -68.1 (BD Bioscience)	<i>biotin-conjugated Rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> monoclonal antibody</i>  Clone: A85-1 (BD Bioscience)
gesamt IgM	<i>purified rat anti-mouse IgM monoclonal antibody</i>  Clone: II/41 (BD Bioscience)	<i>purified mouse monoclonal Immunglobulin Isotyp standard (IgM,κ)</i>  Clone: G155-228 (BD Bioscience)	<i>biotin-conjugated rat anti-mouse IgG<sub>1</sub> monoclonal antibody</i>  Clone: R6-60.2 (BD Bioscience)

**Durchführung:**

Zunächst wurden 96-Loch-Elisa-Platten (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) mit primären anti-Maus Immunglobulin-AK („Capture“-AK) beschichtet. Dafür wurde der Antikörper in „Coating“-Puffer verdünnt (2 µg/ml) und jeweils 50 µl in jedes Loch pipettiert. Nach Inkubation ÜN bei 4°C wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch Zugabe von 250 µl Blockierpuffer je Loch abgesättigt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde 5-mal mit Waschpuffer gewaschen. Jeweils 50 µl der Proben sowie die Standardverdünnungen wurden in jedes Loch pipettiert und die Platte bei 4°C ÜN inkubiert. Es wurde 5-mal mit Waschpuffer gewaschen. Der Detektions-AK wurde verdünnt (2,5 µg/ml) und jedes Loch mit jeweils 50 µl der Verdünnung versetzt. Die Platte wurde dann 2 h bei RT auf dem Rüttler inkubiert. Nach 5-maligem Waschen erfolgt die Zugabe von 50 µl Streptavidin-Peroxidase pro Loch. Erneut wurde die Platte 30 min bei RT auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde 8-mal gewaschen und 100 µl POD-Substrat pro Loch zupipettiert. Unter Sichtkontrolle wurde 10-30 min bei RT inkubiert, bis eine blaue Färbung auftrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Messung erfolgte bei einer Absorption von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

**2.19.2 Neurotrophin-ELISA****Kits:**

E Max Immuno-Assay jeweils NGF, BDNF, NT3, NT4 (Promega, Mannheim, D)

**Lösungen:**

„Carbonat“ *Coating* Puffer: 2,1 g Natriumbicarbonat

2,65 g Natriumcarbonat auf 1 l Aqua dest

10 x TBS Puffer: 48,44 g Tris Base

175,32 g NaCl auf 2 l Aqua dest

TBS/Tween: 1 x TBS

0,05 % Tween 20

**Durchführung:**

Die Elisa wurden entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die Proben unverdünnt eingesetzt wurden.

**2.20 Cytometric Bead Array (CBA)**

Mit Hilfe des verwendeten „Cytometric Bead Arrays (CBA)“ ist es möglich, in einem so genannten Multiplex-Ansatz simultan die Proteinkonzentration mehrerer Cytokine in einer Probe zu messen. Die Methode kombiniert die Durchfluss-cytometrische Analyse einer Fluoreszenz-Intensität mit einem Partikel („bead“-gekoppelten Immunoassay.

**Kits :**

BD™ Cytometric Bead Array (BD Bioscience, San Diego, USA)

**Durchführung:**

Der CBA wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Jeweils 50 µl der vorbereiteten „Capture Beads“ sowie 50 µl des PE „Detection Reagent“ wurden in Analyseröhrchen gegeben und 50 µl der Probe beziehungsweise des Standards in serieller Verdünnung zupipettiert. Nach einer lichtgeschützten 3 stündigen Inkubation bei RT wurden die Proben 1 x gewaschen, in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und nach Kalibration des FACS-Gerätes analysiert. Die Datenanalyse erfolgt mit Hilfe der BD CBA Software sowie Microsoft Excel.

**2.21 Fluorimetrische Messung der intrazellulären Calciumkonzentration**

Fura-2 ist ein fluoreszierender Calciumchelator, der durch Bindung von Calcium bei nahezu identischem Emissionsspektrum sein Exzitationsmaximum von 380 nm nach 340 nm verschiebt [Grynkiewicz et al., 1985]. Der isosbestische Punkt, das heißt die Wellenlänge welche gegenüber Calcium-Änderungen indifferent ist, liegt in Abhängigkeit vom optischen Apparat bei 358-362 nm. Unter Verrechnung der Fluoreszenzsignale der beiden differenten Wellenlängen (340 und 380 nm) lässt sich unabhängig von Änderungen der absoluten Fura-2 Fluoreszenz die freie Calciumkonzentration nach folgender Formel berechnen:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times F_{380_{min}} / F_{380_{max}}$$

$R$  (ratio) steht für das Verhältnis der Fluoreszenzen  $F(340 \text{ nm}) / F(380 \text{ nm})$   $R_{min}$  bezeichnet das Verhältnis von  $F(340 \text{ nm})$  zu  $F(380 \text{ nm})$  bei Abwesenheit von

Calciumionen und  $R_{max}$  selbiges Verhältnis bei Sättigung mit Calcium-Ionen.  $F380_{min}$  und  $F380_{max}$  stehen für die absoluten Fluoreszenz-Intensitäten bei 380 nm unter den oben genannten Bedingungen.  $K_d$  ist die Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium-Ionen und beträgt bei Raumtemperatur (22 °C) 264 nM. Der Ester des Farbstoffes (Fura-2-acetomethylester oder Fura-2-AM) gelangt durch seine Lipophilie leicht durch die Zellmembran. Die intrazelluläre Abspaltung durch verschiedene Esterasen zum freien Fura-2 verhindert ein Rückdiffundieren in den Extrazellularraum.

### Reagenzien und Lösungen:

Fura-2 AM Ester	(Fluka, Taufkirchen, D)
Poly(L)Lysine	(Sigma, Deisenhofen, D)
Lysophosphatic Acid	(LPA, Sigma, Deisenhofen, D)
Anti F(ab) <sub>2</sub> -Fragmente	(Jackson Immunoresearch, West Grove USA)
Ringerlösung:	155 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM D-Glucose, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM CaCl <sub>2</sub> 5 mM Hepes pH 7,4
Lademedium:	RPMI 1640 10 % FCS, 1 µM Fura-2 AM

#### 2.21.1 Beladung von Zellen mit Fura-2

Mononukleäre Zellen wurden aus Knochenmark und Milz mit Histopaque<sup>®</sup>-1077 (siehe 2.8.3) isoliert, gewaschen und mit Fura-2AM durch Inkubation für 30 Minuten im Lademedium bei Raumtemperatur beladen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in Lademedium aufgenommen und auf, mit Poly(L)Lysin (100 µg/ml, Sigma) beschichtete, Glasplättchen aufgebracht. Nach 15 Minuten wurden die Zellen mit Messpuffer gewaschen. B-Zellen des Knochenmarks wurden zusätzlich mit FITC gekoppelten Anti-CD19 Antikörpern angefärbt.

#### 2.22.2 Messung von $[Ca^{2+}]_i$ mittels Fura-2

Die Messung calciumabhängiger Fluoreszenzveränderungen in T- und B-Zellen erfolgte mit einem „Calciumimaging-System“, welches innerhalb von Millisekunden mehrere Wellenlängen messen kann.

Das System besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX70), einem Monochromator mit Steuerungseinheit (Till Photonics) und einer CCD-Kamera (PCO SensiCam). Zur Steuerung des Systems und zur Datensammlung diente ein angeschlossener Computer mit Softwareprogramm (Tillvision). Für die Messung wurden die Glasplättchen mit den adhärenierenden Zellen in eine Kunststoff-Messkammer mit einer runden Aussparung eingespannt, deren Boden das Glasplättchen bildete. Die Kammer wurde mit 450  $\mu$ l Messpuffer gefüllt und 50  $\mu$ l in Messpuffer gelöster Agonist wurde in 10-facher Konzentration (z.B. BDNF, 1  $\mu$ g/ml, PeproTech) während der Messung direkt zupipettiert. Vor der Messung konnten B-Zellen des Knochenmarks, die selektiv mit Hilfe von FITC gekoppelten Anti-CD19 Antikörpern angefärbt worden waren, durch ihre Fluoreszenz bei 530 nm nach Exzitation bei 488 nm identifiziert und mit Hilfe der Software als Messregionen definiert werden. B-Zellen aus der Milz wurden aufgrund einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  nach Applikation von 5  $\mu$ g/ml F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten identifiziert. Eine Vorselektion der vermessenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen war nicht notwendig, da diese Zellen bereits vor der Messung mit hoher Reinheit (> 97%) isoliert wurden. Während des Versuchsablaufes wurden digitale Fluoreszenzbilder der Messregionen nach der Exzitation bei den Wellenlängen 340, 360 und 380 nm gespeichert. Die Software ermittelte aus den Fluoreszenzemissionen nach Exzitation bei 340 nm und 380 nm die Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration über die Zeit aus der oben genannten Formel und stellte diese graphisch dar.

### 2.23 Daten-Analyse und Statistik

Die statistische Auswertung, sowie graphische Darstellung erfolgte durch die Programme Microsoft Excel oder GraphPad Prism<sup>®</sup>. Die dargestellten Daten repräsentieren Original-Messungen. Balkendiagramme stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM („standard error of mean“) dar. Soweit nötig wurde der Student's *t*-Test angewandt, wobei Differenzen unterhalb eines p-Wertes von 0,05 als signifikant betrachtet wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten in der Maus

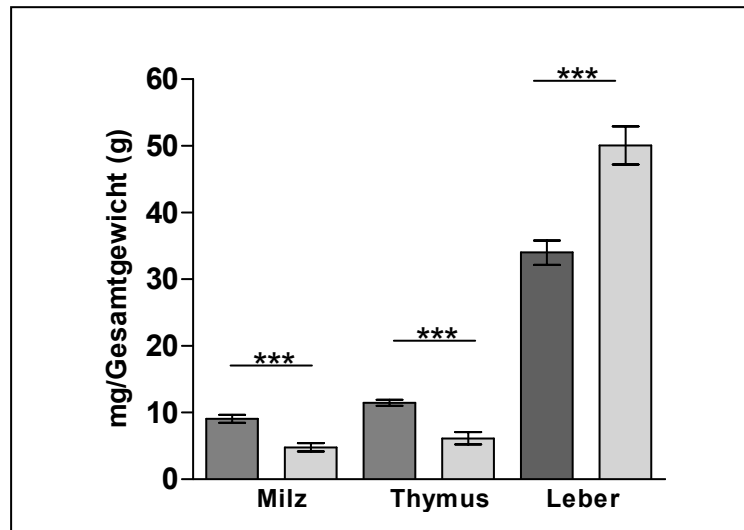
Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Einfluss des Neurotrophins BDNF auf die Entwicklung von B-Zellen in der Maus untersucht.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe des BDNF-defizienten-Mausmodells, der BDNF<sup>tm 1-Jae</sup>-Maus [Ernfors et al., 1994] bearbeitet. Die bisherige phänotypische Charakterisierung der BDNF<sup>-/-</sup>-Maus berücksichtigte ausschließlich Komponenten des Nervensystems. So konnte gezeigt werden, dass BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse einen dramatischen Verlust an Neuronen, hauptsächlich in peripheren sensorischen Ganglien, beispielsweise im vestibular-Ganglion aufweisen. Die Degeneration von viscerio-afferenten Neuronen führt in diesen Mäusen zu schweren Atemproblemen, aufgrund derer homozygote BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen innerhalb der ersten 3-4 Wochen nach Geburt versterben. Die folgenden Untersuchungen wurden daher jeweils am Tag 17 *postpartum* bei BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen beziehungsweise Wildtyp-Geschwistern durchgeführt.

##### 3.1.1 Verringerte Zahl von B-Lymphocyten in der Milz von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen

BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen mit  $4,7 \pm 0,77$  g ein deutlich niedrigeres Gesamtgewicht als ihre Wildtyp-Geschwister ( $8,67 \pm 1,73$  g). Um zu ermitteln, ob immunologische Organe (Milz, Thymus) überproportional von dieser Gewichtsreduktion betroffen sind, wurden die Organgewichte in Relation zum Gesamtgewicht ermittelt.

Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ( $0,91 \pm 0,06$  mg pro g Gesamtgewicht) wiesen BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse mit  $0,48 \pm 0,06$  mg pro g Gesamtgewicht ein deutlich reduziertes Milzgewicht auf (Abb. 3.1). Dieses Phänomen wurde ebenso im Thymus nicht jedoch in der Leber beobachtet (Abb. 3.1). Für dieses Organ wurde in den BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ein sogar ein erhöhtes Gewicht nachgewiesen.



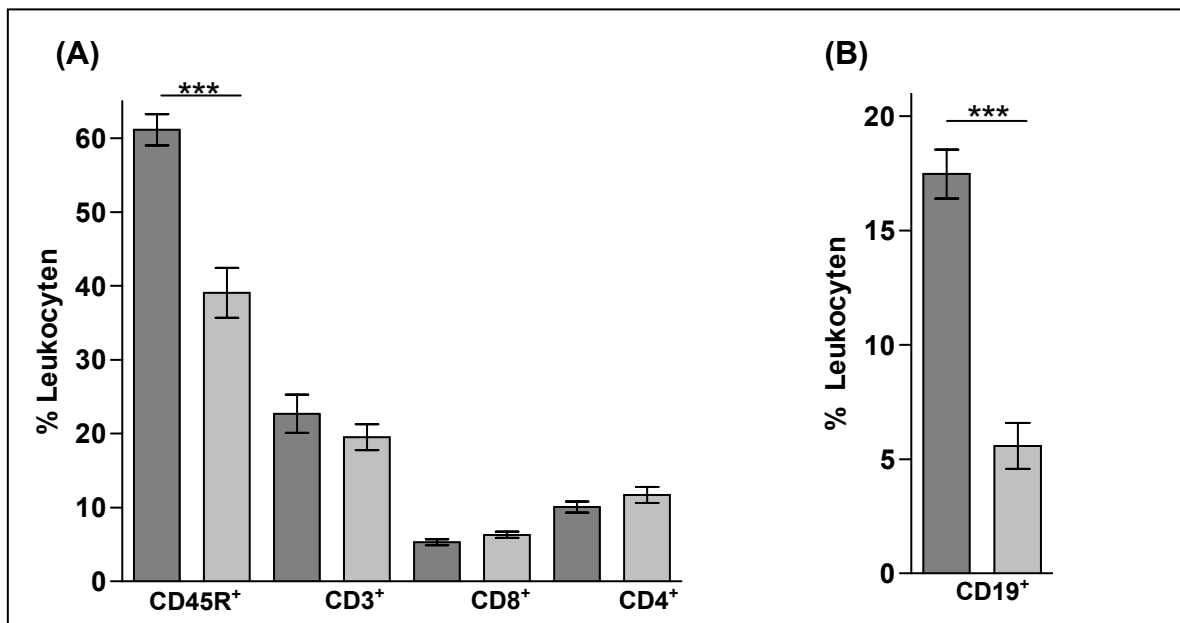
**Abbildung 3.1: Reduziertes Gewicht von Milz und Thymus in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Dargestellt ist das Gewicht (mg) von Milz, Thymus sowie Leber bezogen auf das Gesamtgewicht (g) von BDNF<sup>-/-</sup> (hellgraue Säulen) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (dunkelgraue Säulen). Es sind Durchschnittswerte von mindestens 5 Tieren  $\pm$  SEM (=Standardfehler des Mittelwertes) gezeigt. Statistische Analysen wurden mithilfe der „Students *t*-test“ (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ) durchgeführt.

Zur Klärung der Frage, inwieweit die beobachtete Gewichts-Reduktion immunologischer Organe an eine Reduktion spezifischer Leukozyten-Subpopulationen gekoppelt ist. Hierfür wurden Einzel-Zell-Suspensionen von Milz und Thymus hergestellt. Nach Anfärbung charakteristischer Oberflächenmarker, so genannter CD (=cluster of differentiation) - Antigene mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurde die Verteilung von B- beziehungsweise T-Lymphocyten durchflusscytometrisch untersucht.

Bei der Analyse der Leukozyten-Verteilung in der Milz, konnte kein Unterschied hinsichtlich des relativen Anteils der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) zwischen BDNF<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäusen ermittelt werden (Abb.3.2A). Auch die relative Anzahl der T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) und cytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) war unverändert.

Im Gegensatz dazu war der relative Anteil der B-Zellen (CD45R<sup>+</sup>) in BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen (39.1  $\pm$  9.6%) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (61.1  $\pm$  6.4%) signifikant niedriger.

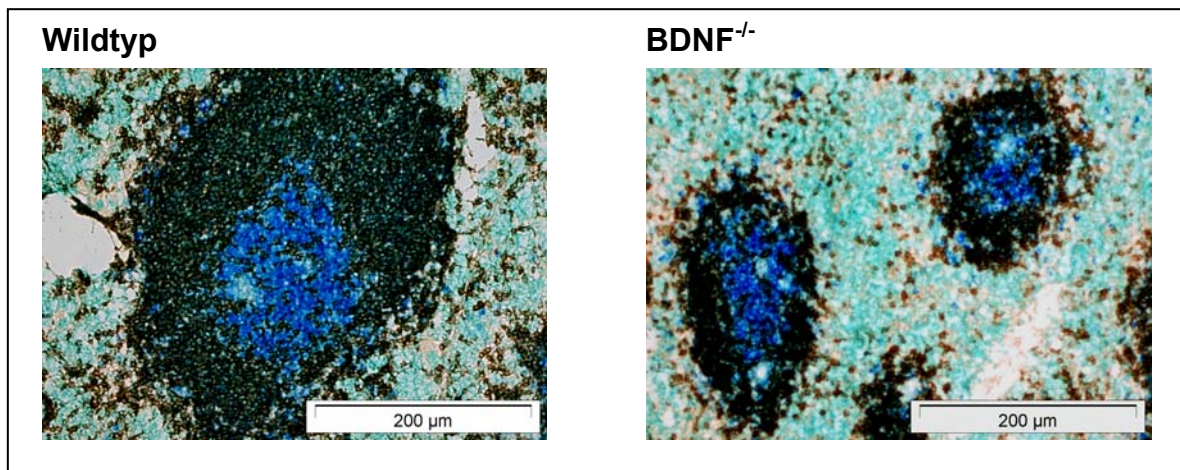
Auch die absolute Anzahl der B-Zellen war in den BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen mit  $3.25 \times 10^6 \pm 0.66$  B-Zellen pro Gramm Gesamtgewicht signifikant niedriger als in Wildtyp-Mäusen ( $6.71 \times 10^6 \pm 0.63$ ).



**Abbildung 3.2: Reduzierter B-Zell-Anteil in Milz und Knochenmark von BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen.** Der relative Anteil von B- und T-Zellen an der Gesamt-Leukozytenzahl in Milz (A) und Blut (B) von Wildtyp (dunkelgraue Säulen) versus BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen (hellgraue Säulen) wurde mittels Durchfluss-Cytometrie bestimmt. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD4, CD8a, CD19, CD45 und CD45R markiert. Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der Subpopulationen an der Gesamt-Leukozytenzahl (WT: n = 9; BDNF<sup>-/-</sup>: n = 8). Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe der „Students *t*-test“ (\*\*\*) durchgeführt.

Anschließend wurde untersucht, in wieweit das Phänomen der spezifischen B-Zell-Reduktion auch bei zirkulierenden B-Zellen beobachtet werden kann. Dazu wurde der Anteil der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>) im Blut bestimmt (Abb.3.2B). Auch hier war der Anteil der B-Zellen in BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen (5.6 ± 0.8%) signifikant niedriger als in Wildtyp-Mäusen (17.5 ± 0.9%).

Um zu untersuchen, ob der reduzierte Anteil der B-Lymphocyten in der Milz mit einer veränderten Milz-Struktur einhergeht, wurden immunhistologische Färbungen von Gefrierschnitten durchgeführt. Hierbei wurden Doppelfärbungen von CD4<sup>+</sup>- und CD45R<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt (Abb.3.3).

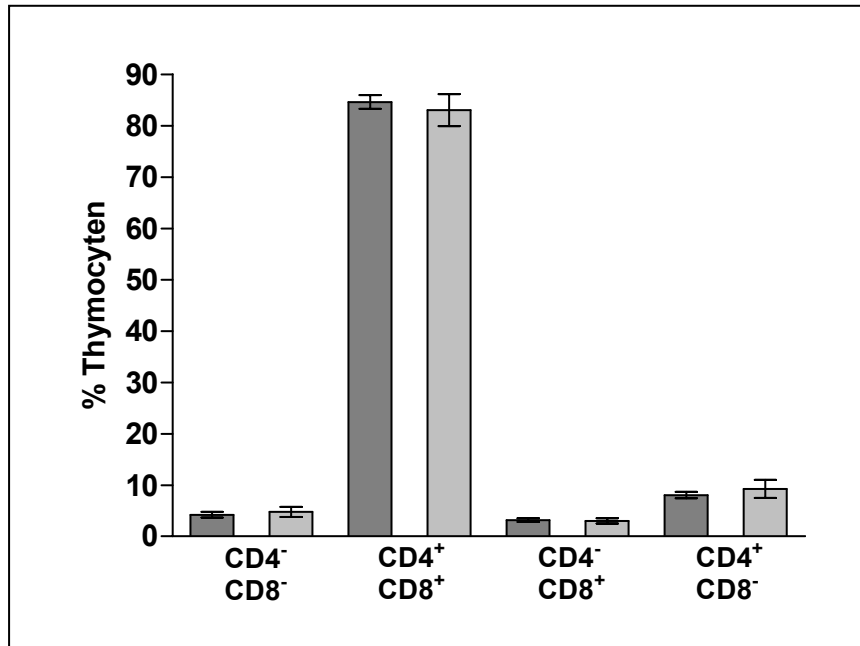


**Abbildung 3.3: Normale Mikroarchitektur der Milz bei BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen.** Gefrierschnitte von WT (A) beziehungsweise BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen (B) wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben gefärbt. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für mehrere Färbungen von jeweils 3 Mäusen pro Genotyp [CD45R<sup>+</sup> Zellen (schwarz-braun), CD4<sup>+</sup> Zellen (blau)] Die Zellkerne wurden mit Methylengrün gegengefärbt.

In der Mikroarchitektur der Milz ließen sich keine Unterschiede zwischen BDNF<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen erkennen. Die Arteriolen beider Milzen waren von Lymphocyten umgeben, wobei die T-Zellen einen inneren Ring um die Arteriolen, die so genannte PALS-Region (*periarteriolar lymphoid sheath*) bildeten, während die B-Zellen diese Region flankierten. Allerdings war diese so genannte B-Zell-Corona in den BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich schmaler als in den Wildtyp-Mäusen.

### 3.1.2 Normale Verteilung von T-Zell-Vorläufern im Thymus von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Stadien der T-Zell-Entwicklung wurden anhand der Expression der Zelloberflächenmoleküle CD4 sowie CD8 mittels Durchfluss-Cytometrie bestimmt. Frühe T-Zellen sind negativ für die Marker CD4 und (CD8CD4/CD8 doppelnegativ) und differenzieren sich nach Rekombination des Locus des T-Zell-Rezeptors (TCR)<sup>beta</sup>-Strangs in CD4/CD8 doppel-positive Zellen. Diese Zellen wiederum können nach einem Prozess zellulärer Selektion entweder zu CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen (T-Helfer-Zellen) oder CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (cytotoxische T-Zellen) heranreifen.



**Abbildung 3.4: Normaler Anteil von T-Zell-Vorläufern im Thymus von BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die Verteilung der Thymocyten-Subpopulationen in WT (dunkelgraue Säulen)- und BDNF<sup>-/-</sup> Mäusen (hellgraue Säulen) wurde mittels Durchfluss-Cytometrie, nach Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen das CD4- und CD8-Antigen, untersucht. Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der Subpopulationen an der Gesamt-Thymocytenzahl (WT: n = 9; BDNF<sup>-/-</sup>: n = 8). Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwertes (=SEM-Wert). Statistische Analysen mithilfe der „Students *t*-test“ ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen BDNF<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen.

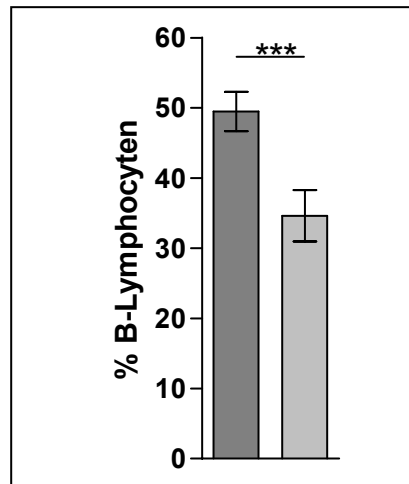
Der prozentuale Anteil der beschriebenen vier Entwicklungsstadien der T-Zellen im Thymus (Abb. 3.4) ergab keinen Unterschied zwischen BDNF<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen (4.2 ± 0.54 % CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, 84,6 ± 1.33 % CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, 8.02 ± 0.61 % CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> sowie 3.17 ± 0.36 % CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>).

Allerdings war das Thymus-Gewicht in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen (0.61 ± 0.09 %) des Gesamtgewichts) im Vergleich zum Wildtyp (1.06 ± 0.05 %) signifikant erniedrigt, so dass auch die Gesamt-Thymocytenzahl signifikant von 21.12 ± 3.07 × 10<sup>6</sup> Thymocyten pro Gramm Gesamtgewicht im Wildtyp auf 9.26 ± 1.42 × 10<sup>6</sup> Zellen in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen verringert war.

### 3.1.3 Gestörte B-Zell-Entwicklung in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen

Um zu analysieren, ob die beobachtete B-Zell-Defizienz in Milz und Blut mit einer gestörten B-Zell-Entwicklung im Knochenmark einhergeht, wurde zunächst der Anteil der B-Zellen im Knochenmark untersucht (Abb.3.5).

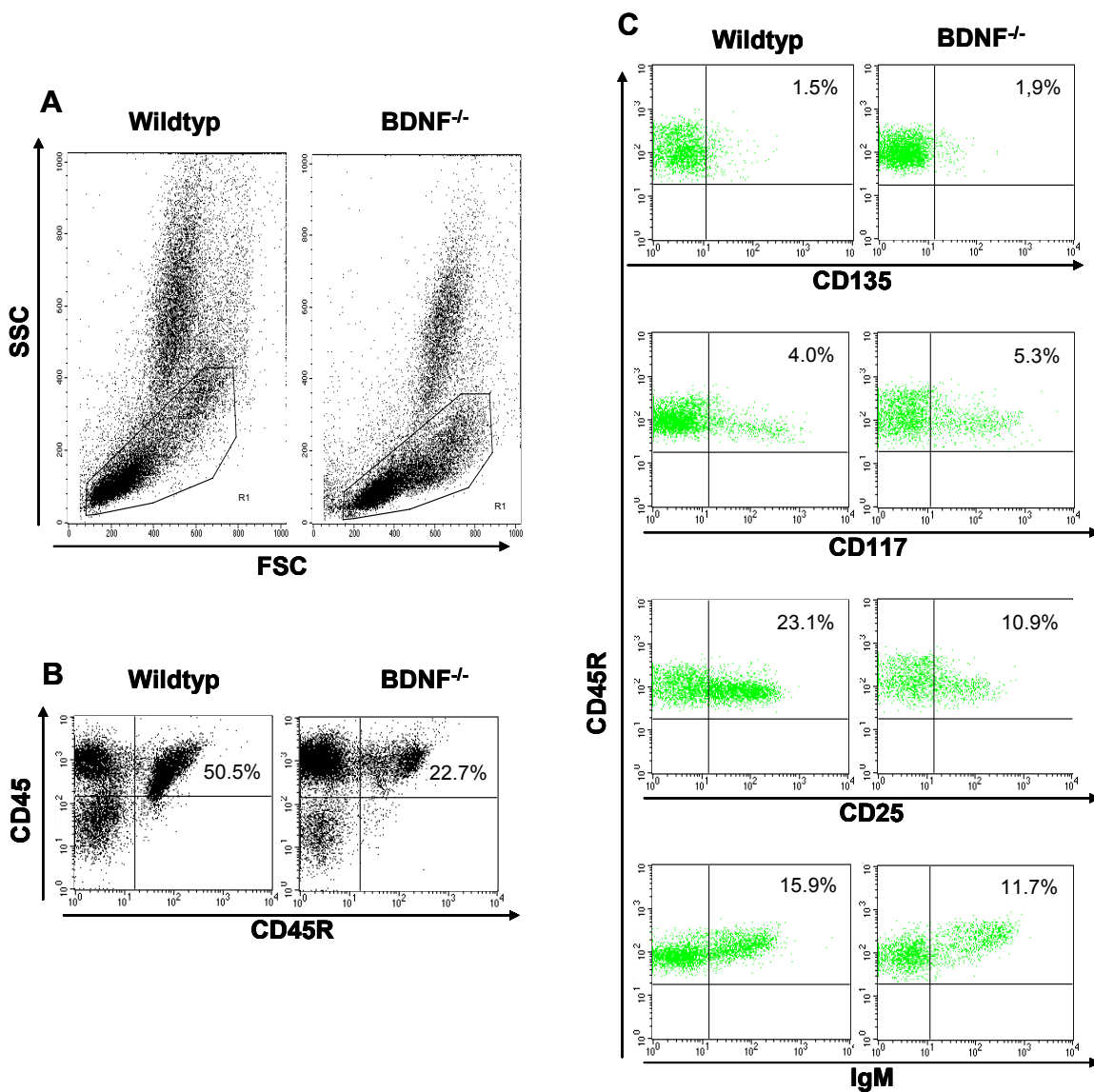
Auch hier war die relative Anzahl der B-Zellen in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $34.6 \pm 4.1 \%$ ) signifikant niedriger als in Wildtyp-Mäusen ( $49.5 \pm 2.8\%$ ).



**Abbildung 3.5: Verringerter Anteil der B-Zellen im Knochenmark von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Leukocyten aus dem Knochenmark wurden mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper gegen das CD45- (Lymphocyten) and CD45R- (B Zellen) Oberflächen-Antigen gefärbt und Durchfluss-cytometrisch untersucht. Dargestellt ist der durchschnittliche Anteil der B-Zellen an der Gesamt-Leukocytenzahl von WT- (dunkelgraue Säulen; n = 9) und BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen (hellgraue Säulen; n = 8). Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe der „Students t-test“ (\*\*\*) durchgeführt.

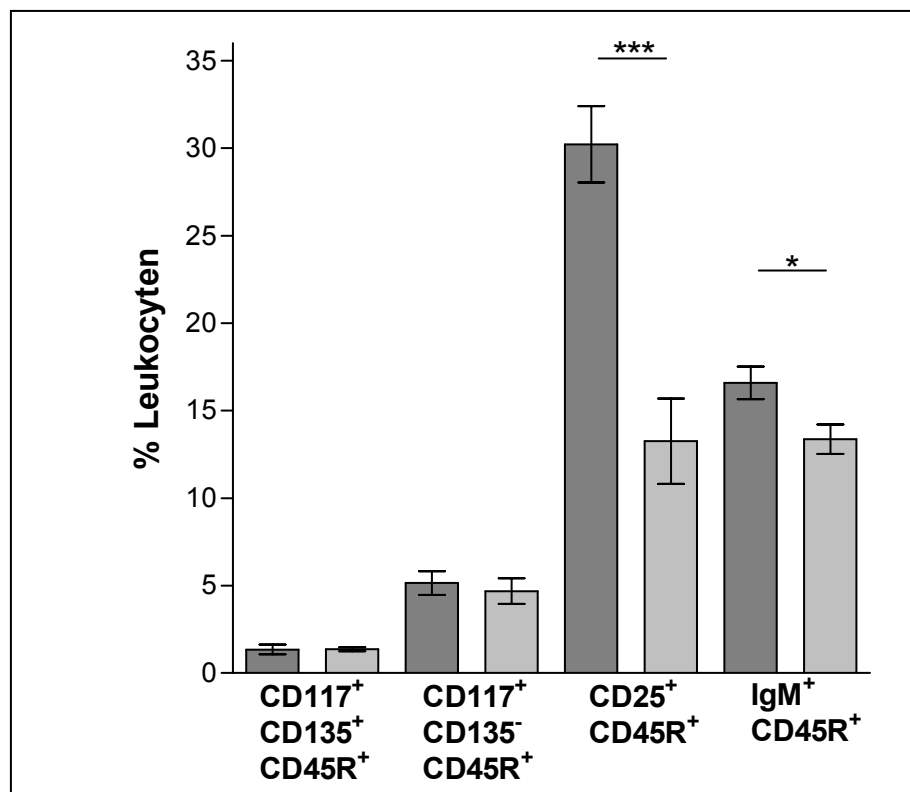
Die B-Zell-Lymphopoese im Knochenmark ausgehend von Pro (*progenitor*)- und Pre (*precursor*)-B-Zellen wurde in unreifen (immaturen) sowie reifen (mature) B-Zellen durch die Identifizierung der differentiellen Expression von Zell-Oberflächen-Markern, wie bereits in der Einführung beschrieben und illustriert, analysiert. Vier Entwicklungsstadien wurden in Anlehnung an die Klassifizierung von Melchers und Rolink [1996] untersucht:

- (i) Pro-B Zellen (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>),
- (ii) Pro-B/Pre-BI Zellen (CD45R<sup>+</sup>/ CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD25<sup>-</sup>/IgM<sup>-</sup>),
- (iii) *large/small* Pre-BII Zellen (CD45R<sup>+</sup>/CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup>/IgM<sup>-</sup>),
- (iv) Immature/Mature B Zellen (CD45R<sup>+</sup>/ CD135<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD25<sup>-</sup>/IgM<sup>+</sup>).



**Abbildung 3.6: Repräsentative Durchfluss-Cytometrische Analyse der B-Zellen aus dem Knochenmark von BDNF<sup>-/-</sup>- und WT-Mäusen.** Die dargestellten Zahlen geben den prozentualen Anteil der Zellen in rechten oberen Quadranten relativ zur Gesamt-Leukocytenzahl wieder. (A): Aufgrund ihrer relativen Strahlungsintensität im *Forward scatter* (FSC) und *Side scatter* (SSC) wurden die Lymphocyten identifiziert. (B): CD45 versus CD45R FACS-Profil. B-Zellen wurden durch die Expression von CD45 und CD45R identifiziert und durch ein so genanntes *gating* selektiert. (C): Innerhalb der so vorselektierten B-Zellen wurde die Expression weiterer Marker analysiert: CD135, CD117, CD25 oder Oberflächen-IgM.

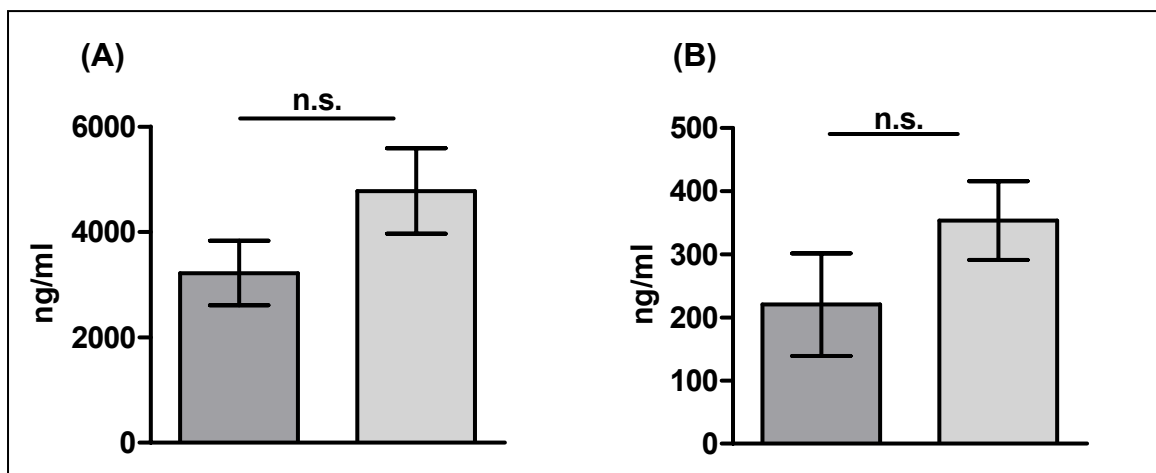
Es konnte gezeigt werden, dass die beschriebene B-Zell-Defizienz im Knochenmark der BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse auf spezifische Entwicklungsstadien beschränkt ist (Abb. 3.6 und Abb.3.7). In sehr frühen Stadien, Pro-B Zellen ( $1.3 \pm 0.3\%$  versus  $1.4 \pm 0.4\%$ ) und Pro-B/Pre-BI Zellen ( $5.2 \pm 0.7\%$  versus  $4.7 \pm 0.8\%$ ), wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen- und Wildtyp-Mäusen gefunden (Abb. 3.7). Im Gegensatz dazu waren die Pre-BII-Zellen ausgehend von  $30.2 \pm 2.2\%$  in Wildtyp-Mäusen auf  $13.3 \pm 2.7\%$  in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert. Der Anteil späterer Entwicklungsstadien bestehend aus immaturren und maturaen B-Zellen war ebenfalls signifikant reduziert ( $16.6 \pm 0.9\%$  versus  $13.4 \pm 0.9\%$ ).



**Abbildung 3.7: Erniedrigter Anteil von Pre-BII-Zellen und immaturren B-Zellen im Knochenmark von BDNF<sup>-/-</sup>- Mäusen.** Zur Klassifikation der Entwicklungsstadien wurden Knochenmarkszellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD45, CD45R and CD135 (Pro-B-Zellen), CD117 (Pro/pre-B-I-Zellen), CD25 (Pre-B-II-Zellen) oder Oberflächen-IgM (immaturre/mature B-Zellen) gefärbt und Durchfluss-cytometrisch untersucht. Dargestellt ist der durchschnittliche Anteil der B-Zell-Entwicklungsstadien an der Gesamt-Leukocytenzahl von WT-(dunkelgraue Säulen; n = 9) und BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen (hellgraue Säulen; n = 8). Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe des „Students t-test“ (\*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01) durchgeführt.

### 3.1.4 Normale *in vitro* Antikörper-Produktion von B-Lymphocyten aus BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine gestörte Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark, mit daraus resultierenden geringeren Anteilen von muren B-Zellen in Knochenmark und Peripherie, hin. Die Tatsache, dass die muren B-Zellen sowohl IgM als auch IgD (Daten nicht gezeigt) auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigt jedoch, dass die B-Zellen, wenn sie den Entwicklungsblock überwunden haben, eine normale Entwicklung durchlaufen und somit möglicherweise eine adäquate Funktionalität aufweisen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung scheidet eine Bestimmung der *in vivo* Produktion von Immunglobulinen aus, da die BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer Lebenserwartung von höchstens 3-4 Wochen zu jung für Infektions-/Immunisierungs-Versuche sind und ihr Grundspiegel an Serum-Immunglobulinen von IgG-Molekülen dominiert wird, die im Darm über einen pH-Gradienten aktiv aus der Muttermilch ins Blut aufgenommen werden.



**Abbildung 3.8: Normale *In vitro* Antikörperproduktion isolierter Splenocyten von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Jeweils 4-mal 10<sup>5</sup> Splenocyten aus WT- (dunkelgraue Säulen, n=3) und BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen (hellgraue Säulen, n=3) wurden *in vitro* durch Zugabe von SAC sowie anti-CD40 Antikörpern stimuliert. Nach 5 Tagen wurde die Produktion von (A): IgG-Antikörpern beziehungsweise (B): IgM-Antikörpern mittels Elisa-Messung bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Durch statistische Analysen mithilfe des „Students *t*-test“ wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt

Somit wurden für eine *in vitro* Aktivierung Lymphocyten aus der Milz von WT- und BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen gereinigt und die Antikörperproduktion sowie Proliferation nach Zugabe polyklonaler Mitogene getestet (Abb.3.8).

Die Stimulation isolierter Splenocyten durch Zugabe von Präparationen des *Staphylococcus aureus* Stammes Cowan1 (SAC) sowie Kostimulation mit anti-CD40 Antikörpern führte sowohl in WT- als auch in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen zur Produktion von IgG<sub>1</sub>- und IgM-Antikörpern (Abb.3.8). Ein quantitativer Unterschied konnte weder für die Produktion von IgG<sub>1</sub>-Antikörpern (WT: 3,22±0,61 µg/ml, BDNF<sup>-/-</sup>: 4,78±0,81 µg/ml) noch von IgM-Antikörpern (WT: 220,5±81,2 ng/ml, BDNF<sup>-/-</sup>: 353,7± 62,4 ng/ml) nachgewiesen werden.

Die Produktion von anderen Immunglobulin-Isotypen, wie IgG<sub>2a</sub>, IgE oder IgA wurde nicht untersucht

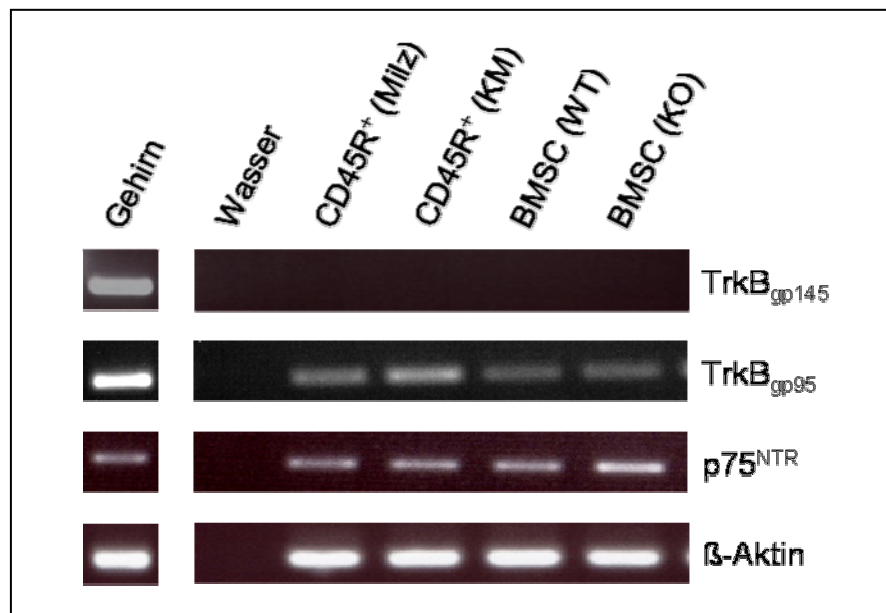
### 3.1.6 Expression der BDNF-Rezeptoren in Milz und Knochenmark

Anschließend wurde die Expression der BDNF-Rezeptoren in isolierten B-Zellen aus Knochenmark und Milz von Wildtyp-Mäusen, sowie in kultivierten Knochenmark-Stromazellen (BMSCs = *bone marrow stromal cells*) von BDNF<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen analysiert. Hierzu wurde RNA aus den isolierten Zellen gewonnen und die Expression von Rezeptor mRNA mittels RT-PCR untersucht (Abb.3.10). Die Etablierung der PCR erfolgte mit cDNA, die aus RNA-Präparationen von Gehirnbiosien aus Wildtyp-Mäusen gewonnen wurde, da in diesem Gewebe alle Neurotrophin-Rezeptoren exprimiert werden. In jedem Ansatz entstand ein spezifisches Produkt, dessen Größe durch gleichzeitiges Auftragen eines Größenmarkers im Agarose-Gel bestimmt wurde. Die Größe der amplifizierten Fragmente entsprach der jeweils erwarteten Produktgröße (TrkB<sub>gp95</sub>: 196 bp, TrkB<sub>gp145</sub>: 161 bp, p75<sup>NTR</sup>: 175 bp).

Als interne Positiv-Kontrolle diente der Nachweis einer β-Aktin-Expression (123bp).

Die Expression des Pan-Neurotrophin-Rezeptors p75<sup>NTR</sup> wurde sowohl in B-Zellen der Milz, als auch in B-Zellen des Knochenmarks nachgewiesen (Abb.3.10). Auch BMSCs aus WT- oder BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen exprimierten diesen Rezeptor. Das gleiche Expressionsmuster zeigte auch der verkürzte BDNF-Rezeptor TrkB<sub>gp95</sub>.

Eine Expression des Volllänge-Rezeptors,  $\text{TrkB}_{\text{gp145}}$  konnte in keiner der untersuchten Zell-Typen nachgewiesen werden



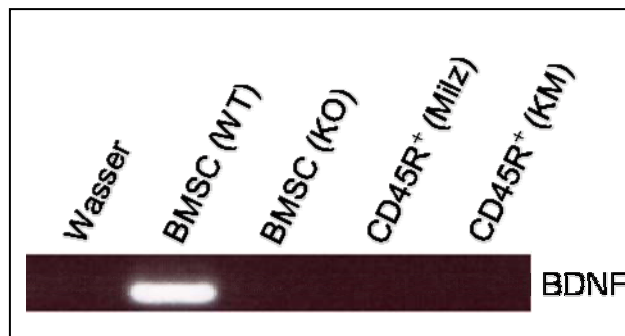
**Abbildung 3.10: Expression der BDNF-Rezeptoren in B-Zellen und BMSCs.** B-Zellen ( $\text{CD45R}^+$ ) wurden aus Milz und Knochenmark (KM) von WT-Mäusen wie in *Material und Methoden* beschrieben isoliert. *Bone marrow stromal cells* (BMSC) wurden von  $\text{BDNF}^{-/-}$ - und WT-Mäusen isoliert. Die Expression von  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ , sowie des Voll-Länge-Rezeptors ( $\text{TrkB}_{\text{gp145}}$ ) beziehungsweise der verkürzten ( $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$ ) Isoform wurde mittels RT-PCR analysiert. Als Positiv-Kontrolle für eine Rezeptor-Expression diente RNA aus dem Gehirn von WT-Mäusen. Die Expression der *house-keeping* Gens  $\beta$ -Aktin wurde als interne Kontrolle eingesetzt.

### 3.1.7 Expression von BDNF und in Milz und Knochenmark

Auch wenn eine Expression des „klassischen“ BDNF-Rezeptors  $\text{TrkB}_{\text{gp145}}$  nicht in B-Zellen nachgewiesen werden konnte, besteht aufgrund der Expression des verkürzten Rezeptors  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$  sowie  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  die Möglichkeit eines direkten Effektes von BDNF auf diese Zellen.

Deshalb wurde die Expression von BDNF in isolierten B-Zellen aus Knochenmark und Milz von Wildtyp-Mäusen untersucht (Abb. 3.11).

Weder in B-Zellen des Knochenmarks noch in B-Zellen aus der Milz konnte eine BDNF-Expression nachgewiesen werden.



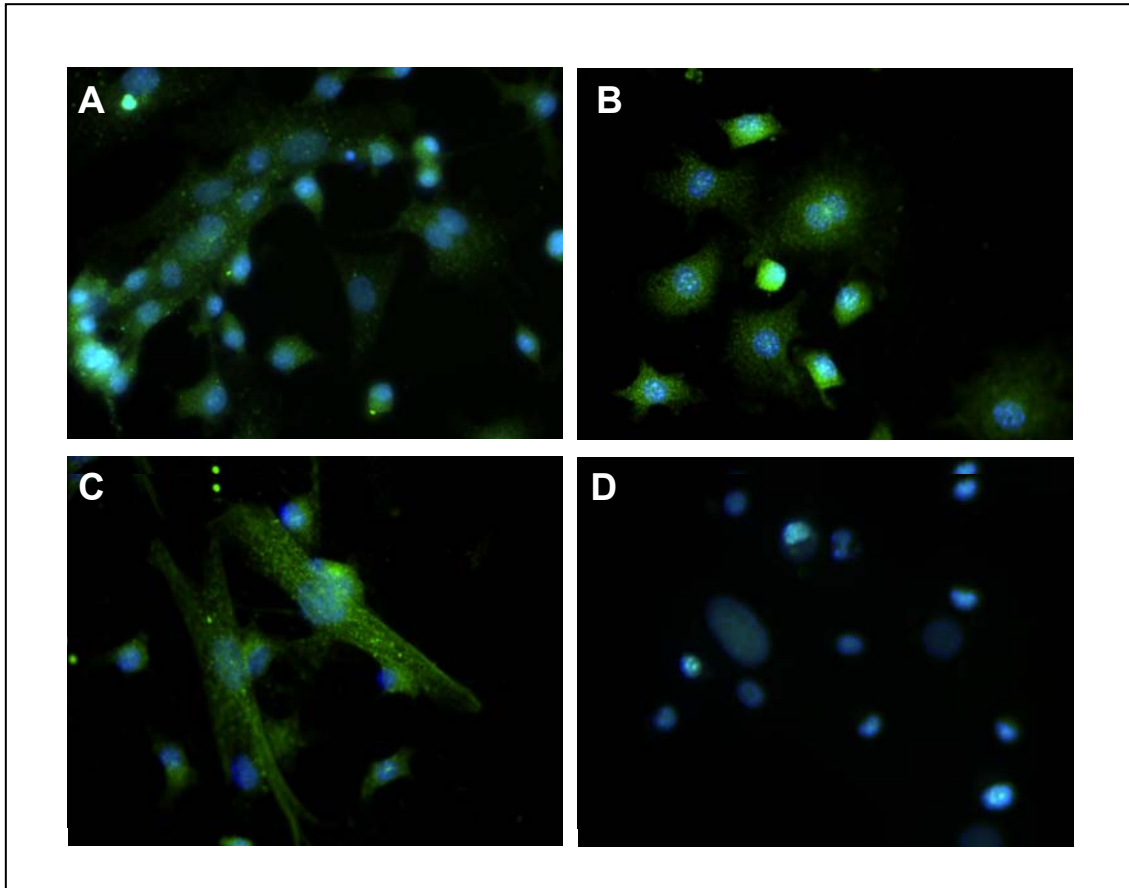
**Abbildung 3.11: Expression von BDNF in Milz und Knochenmark.** Knochenmark-Stromazellen (BMSCs) wurden von BDNF<sup>-/-</sup> (KO)- und WT-Mäusen (WT) isoliert und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Isolation von B-Zellen aus Milz und Knochenmark erfolgte aus WT-Mäusen. Die Expression von BDNF wurde mittels RT-PCR analysiert.

Im Gegensatz dazu konnte eine BDNF-Expression in RNA-Präparationen des Gesamt-Knochenmarks sowie in kultivierten BMSCs nachgewiesen werden (Abb.3.11). In diesen Geweben entstand durch PCR ein spezifisches Produkt der erwarteten Größe (149 bp).

Daraufhin wurde die Protein-Konzentration von BDNF im Überstand konfluenten BMSC-Kulturen aus WT-Mäusen bestimmt. Mittels Elisa konnte eine Konzentration von  $12.9 \pm 2.1$  pg/ml ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse wurden durch eine immunhistochemische Färbung von Neurotrophinen in konfluenten BMSC-Kulturen mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper bestätigt. Auch hier konnte eine deutliche Expression von BDNF nachgewiesen werden (Abb.3.12 B). Neben BDNF zeigten die BMSCs auch eine deutliche Expression von NGF und NT3 (Abb.3.12 A, C).

Stromazellen des Knochenmarks produzieren demnach Neurotrophine und sezernieren sie.

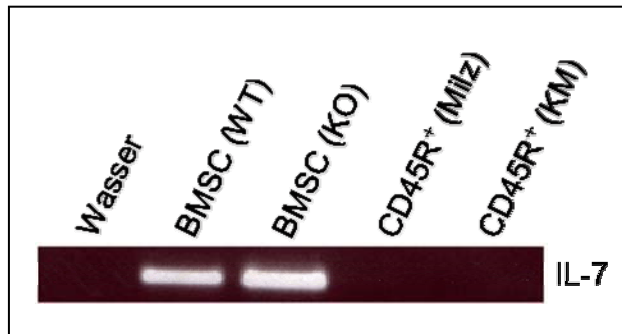


**Abbildung 3.12: Expression von Neurotrophinen in BMSCs.** Knochenmark-Stromazellen (BMSCs) wurden von WT-Mäusen isoliert und kultiviert. Die Expression von NGF (A), BDNF (B) beziehungsweise NT-3 (C) wurde immunhistochemisch nachgewiesen. Als Kontrolle diente eine Färbung ohne den Primärantikörper (D). Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI. Die Vergrößerung beträgt 400. Die dargestellten Abbildungen sind repräsentativ für mehrere Färbungen.

### 3.1.8 Expression von IL-7 in BMSCs von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen

Da BMSCs sowohl p75<sup>NTR</sup> als auch TrkB<sub>gp95</sub> exprimieren, könnte eine autokrine BDNF-Wirkung in diesen Zellen die Cytokin-Expression modifizieren und somit die B-Zell-Entwicklung beeinflussen.

Ein Schlüssel-Cytokin für den Übergang der B-Zellen aus dem Pro-B-Stadium in das Pre-B-Stadium ist, das von BMSCs produzierte, Interleukin-7 (Freedden-Jeffry et al., 1995; Billips et al., 1992). Deshalb wurde die mRNA Expression dieses Cytokins in BMSCs aus WT- beziehungsweise BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt (Abb.3.13).



**Abbildung 3.13: Expression von Interleukin-7 (IL-7) in Milz und Knochenmark.** Knochenmark-Stromazellen (BMSCs) wurden von BDNF<sup>-/-</sup> (KO)- und WT-Mäusen (WT) isoliert und bis zu Konfluenz kultiviert. Die Isolation von B-Zellen aus Milz und Knochenmark erfolgte aus WT-Mäusen. Die Expression von IL-7 wurde mittels RT-PCR analysiert.

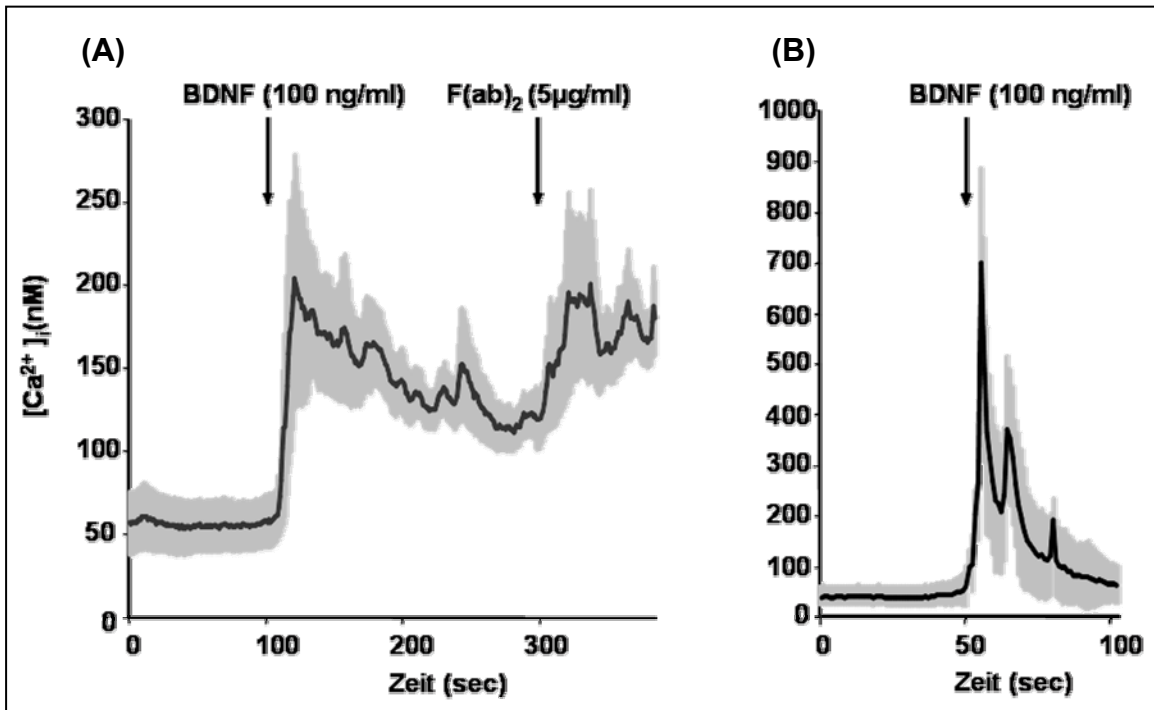
Eine IL-7 mRNA Expression konnte sowohl in WT- als auch in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen durch ein spezifisches PCR-Produkt (214 bp) nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Weiterhin ergab eine quantitative Bestimmung der IL-7 mRNA Expression mittels Real-time PCR ähnliche Expressions-Werte in beiden Quellen (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.9 Intrazellulärer Calcium-Einstrom durch BDNF in B-Lymphocyten

Die Expression der BDNF-Rezeptoren TrkB<sub>gp95</sub> und p75<sup>NTR</sup> in B-Lymphocyten deutet auf eine Sensitivität dieser Zellen gegenüber BDNF hin. Da bereits gezeigt wurde, dass eine Aktivierung von TrkB<sub>gp95</sub> und p75<sup>NTR</sup> einen zellulären Calcium-Einstrom auslöst [Rose et al., 2003; Jiang et al., 1999], wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in isolierten B-Lymphocyten nach BDNF-Applikation gemessen (Abb.3.14).

In der Anwesenheit von 2 mM extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> lag die durchschnittliche Konzentration an intrazellulärem Calcium in B-Lymphocyten (n = 12) aus der Milz bei 56 ± 0.17 nM. Nach Zugabe von 100 ng/ml BDNF erhöhte sich die intrazelluläre Calcium-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auf 200 ± 70 nM und nahm dann in langen oszillierenden Wellen langsam ab (Abb.3.14 A). Die Identifikation der

B-Lymphocyten in der Milz erfolgte über eine, durch Zugabe von F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten (5 µg/ml) induzierte, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Erhöhung zu einem späteren Zeitpunkt.



**Abbildung 3.14: Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in B-Zellen durch BDNF.** Mononukleäre Zellen aus Milz (A) und Knochenmark (B) von WT-Mäusen wurden mit dem Ca<sup>2+</sup> Indikator Fura-2 beladen. Die Messungen wurden wie in *Material und Methoden* beschrieben durchgeführt. BDNF (100 ng/ml) sowie 5 µg/ml anti F(ab)<sub>2</sub>-Fragmente wurden zu den angegebenen Zeitpunkten appliziert. Die schwarze Linie stellt die durchschnittliche [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Konzentration von mindestens 12 Zellen aus 6 verschiedenen Experimenten dar. Graue Flächen kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert).

B-Zellen aus dem Knochenmark wurden mit FITC-gekoppelten anti-CD19-Antikörpern markiert und durch ihre Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm vorselektiert. Die Zugabe von 100 ng/ml BDNF führte hier zu einem Anstieg von [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> auf 700 ± 184 nM (n = 13) (Abb. 3.14 B).

### **3.2 Funktionelle Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

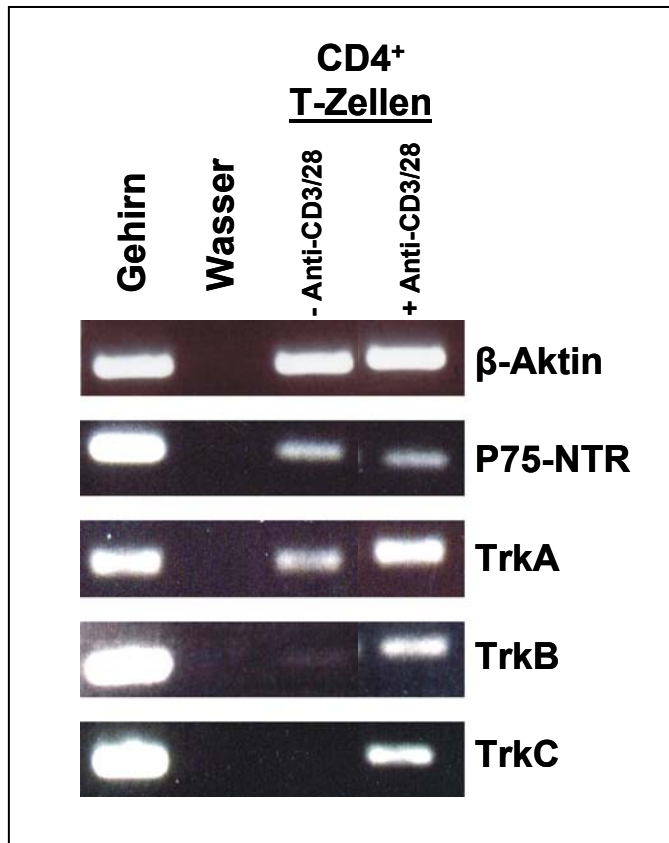
In zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von Neurotrophinen auf die Funktion von T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) untersucht. Ausgehend von einem Pilotexperiment, indem eine Aktivierungs-abhängige Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen beobachtet wurde, ist der Einfluss von Neurotrophinen auf die Cytokin-Produktion, Proliferation sowie das Überleben von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht worden.

#### **3.2.1 Expression von Neurotrophin-Rezeptoren durch *in vitro* stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

##### **3.2.1.1 Expression der Neurotrophin-Rezeptoren mRNA**

Die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) wurde zunächst auf mRNA-Ebene untersucht, wobei das Design geeigneter Oligonukleotide derart erfolgte, dass jeweils die vollständige Isoform des Rezeptors amplifiziert wurde. Als Positiv-Kontrolle diente cDNA aus humaner Gehirn RNA. Die Amplifikation der Rezeptoren lieferte jeweils ein spezifisches PCR-Produkt (TrkA: 299 bp, TrkB: 202 bp, TrkC: 150 bp, p75<sup>NTR</sup>: 184 bp). Als interne Positiv-Kontrolle diente der Nachweis der  $\beta$ -Aktin-Expression (224 bp). Zunächst wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wie beschrieben aufgereinigt und durch Zugabe von anti-CD3/CD28-Antikörpern polyklonal stimuliert. Nach Aufreinigung der RNA wurde die Rezeptor-Expression mittels RT-PCR analysiert (Abb. 3.15).

Eine Expression des pan-Neurotrophin-Rezeptors p75<sup>NTR</sup> konnte sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Auch der NGF-Rezeptor TrkA wurde sowohl unter Basalbedingungen als auch in stimulierten Zellen exprimiert. Allerdings konnte weder der BDNF-Rezeptor (TrkB), noch der NGF-Rezeptor (TrkC) in nicht stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Diese Rezeptoren werden selektiv erst nach einer Aktivierung der Zellen exprimiert.



**Abbildung 3.15 : Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden mittels magnetischer Zell-Separation isoliert und durch Zugabe von Anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Nach 24 h wurde RNA gereinigt und die Expression der Neurotrophin-Rezeptoren mittels RT-PCR analysiert, wobei cDNA aus dem Gehirn als Positiv-Kontrolle diente. Als interne Positiv-Kontrolle wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin untersucht.

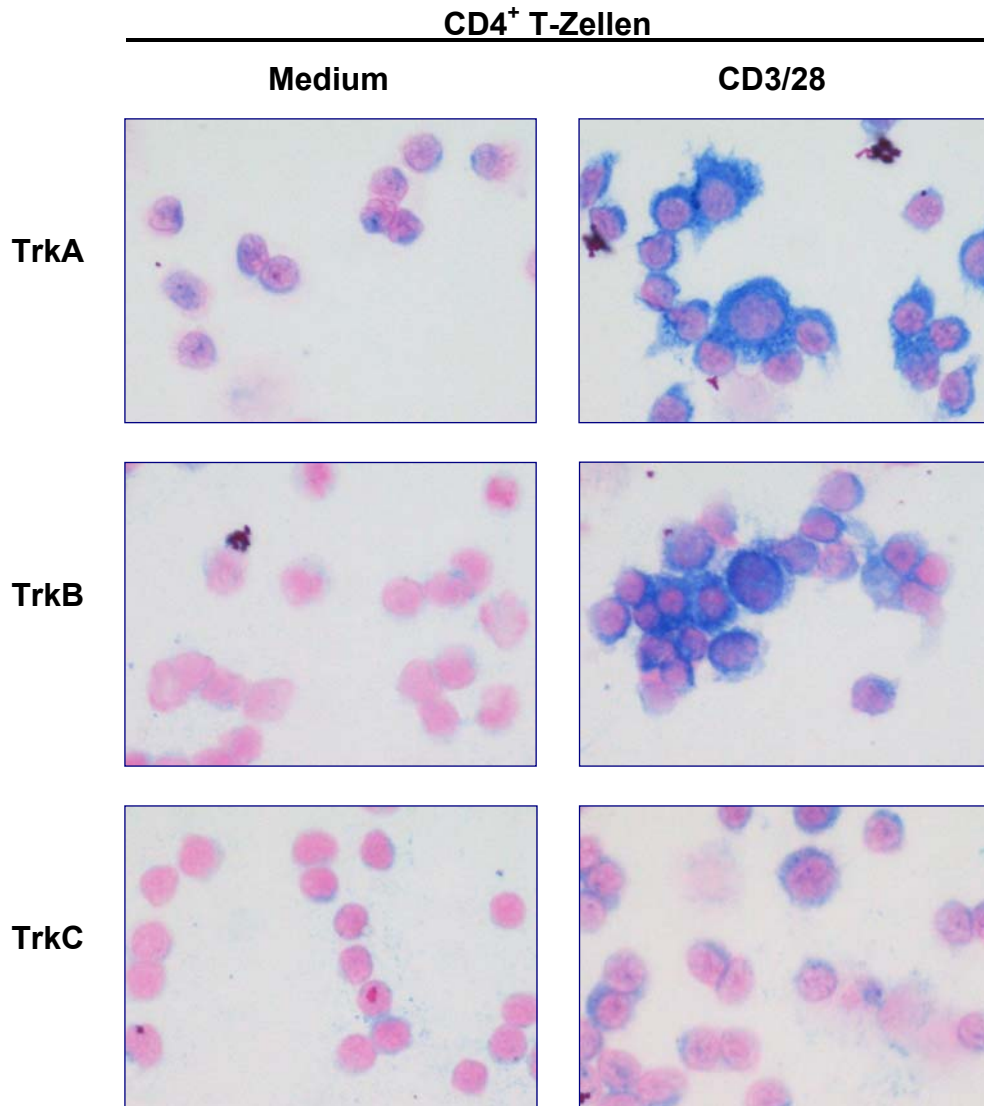
### 3.2.1.2 Expression der Neurotrophin-Rezeptoren

Nachdem eine Expression von Neurotrophin-Rezeptor-mRNA in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen belegt wurde, sollte die Expression der Trk-Rezeptoren auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden.

Hierfür wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aufgereinigt, für 48h mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern polyklonal stimuliert und mittels Cytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht. Durch eine immunhistochemische Färbung (ABC-Methode) wurden die einzelnen Rezeptoren nachgewiesen (Abb.3.16).

Wie aus den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen zu erwarten war, wurde TrkA bereits unter basalen Bedingungen exprimiert wird.

Allerdings konnte eine deutliche Steigerung der Expression nach Stimulation der Zellen nachgewiesen werden. Auch hinsichtlich der TrkB- und TrkC-Expression bestätigten sich die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse. Beide Rezeptoren zeigten erst nach einer Stimulation durch anti-CD3/CD28-Antikörper eine deutliche Expression, wobei TrkC insgesamt die geringste Expression aufwies.

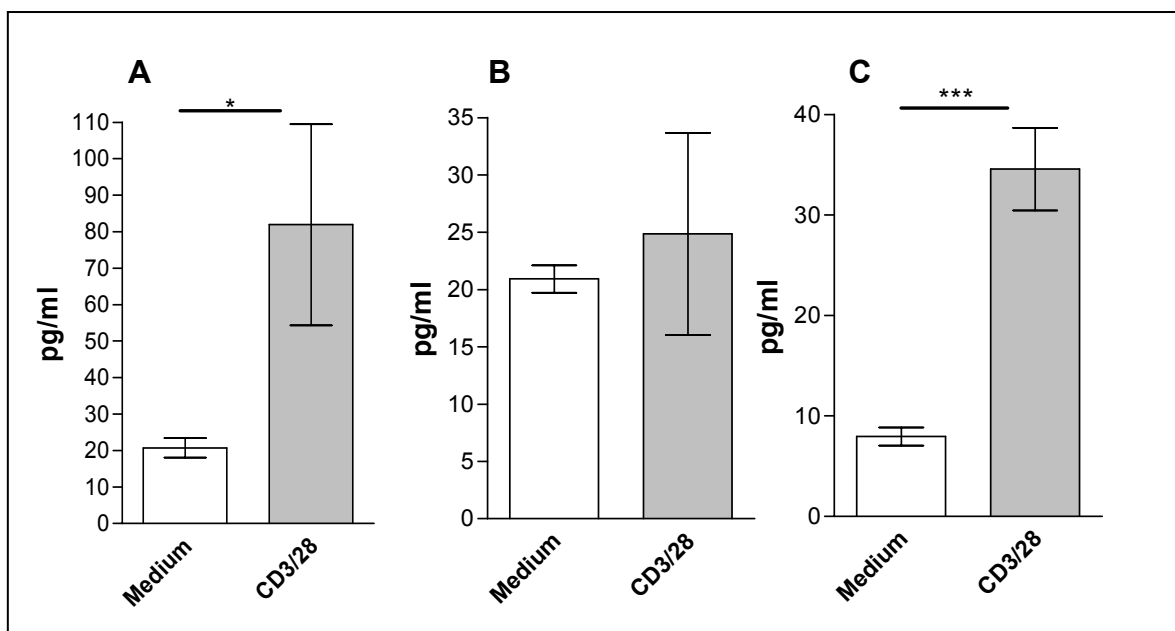


**Abbildung 3.16 Expression der Neurotrophin-Rezeptoren in stimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Nach 48 h erfolgte die immunohistochemische Färbung von TrkA, TrkB sowie TrkC. Zellkerne wurden mit Nuklear Fast Red gegengefärbt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen für mehrere unabhängige Färbungen.

### 3.2.2 Neurotrophin-Produktion durch *in vitro* stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Die Aktivierungs-abhängige Expression der Neurotrophin-Rezeptoren in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wirft die Frage auf, ob die Zellen auch Neurotrophine produzieren und somit ein autokriner Wirkmechanismus zugrunde liegt.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wie zuvor beschrieben gereinigt und mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Nach 48 h wurde der Zell-Kultur-Überstand abgenommen und die vorhandene Menge an NGF (Abb. 3.17A), BDNF (Abb.3.17B) sowie NT3 (Abb.3.17C) durch ELISA-Messung bestimmt.



**Abbildung 3.17: Neurotrophin-Produktion durch stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und mit Anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert (dunkelgraue Säulen). Als Kontrolle dienten unstimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (weiße Säulen). Nach 48 h wurde der Zell-Kultur-Überstand abgenommen und vorhandene Menge an NGF (A), BDNF (B) sowie NT3 (C) durch ELISA-Messung bestimmt. Jeweils mindestens 4 unterschiedliche Ansätze wurden ausgewertet. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe des „Students *t*-test“ (\**p* < 0.051, \*\**p* < 0.01) durchgeführt.

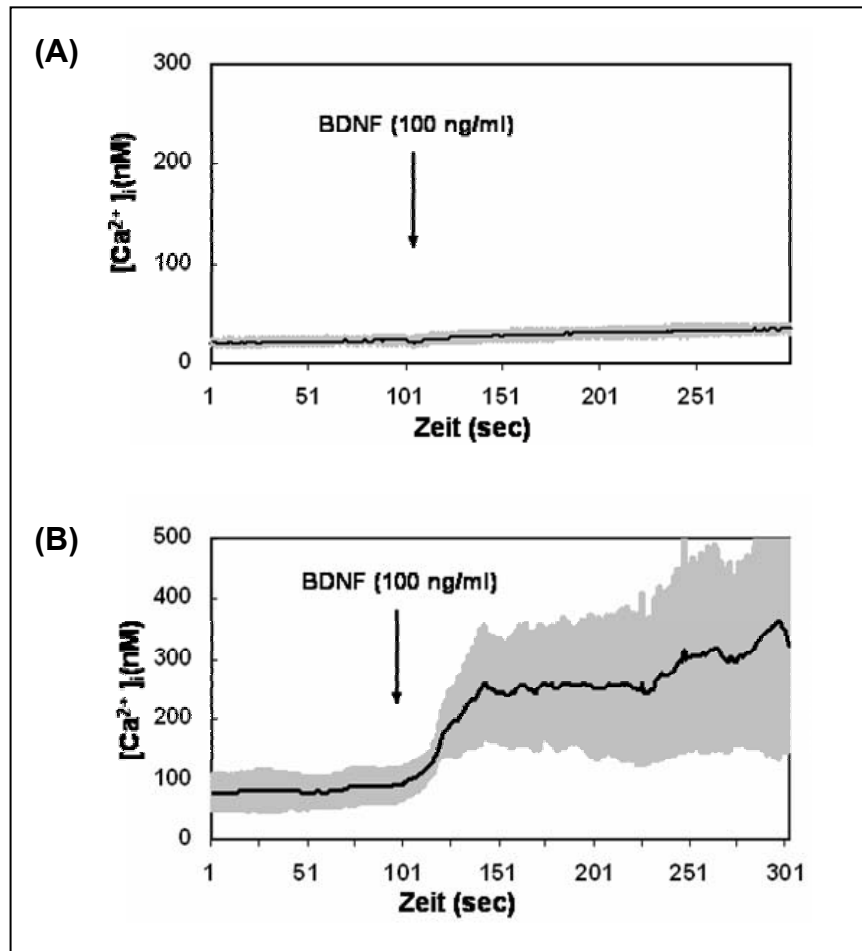
Die Aktivierung der Zellen führte zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von NGF sowie NT3 im Zell-Kultur-Überstand. Während in Überständen von unstimulierten Zellen 20,71 ± 2,68 pg/ml NGF nachgewiesen wurden, stieg die Konzentration in stimulierten Zellen auf 81,91 ± 27,59 pg/ml. Auch die

Konzentration von NT3 stieg im Vergleich zu unstimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (7,95 ± 1,21 pg/ml versus 34,56 ± 4,11 pg/ml) an. Allerdings führte die Aktivierung zu keiner signifikanten Änderung der BDNF-Konzentration in den Zellkultur-Überständen (20,92 ± 7,95 pg/ml versus 24,86 ± 8,82 pg/ml).

### 3.2.3 Induktion eines intrazellulären Calcium-Einstroms in T-Lymphocyten durch BDNF

Die Aktivierungs-abhängige Expression der Neurotrophin-Rezeptoren in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie die für NGF und NT3 nachgewiesene Aktivierungs-abhängige Produktion von Neurotrophinen führte zu der Annahme, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen einem autokrinen Neurotrophin-Wirkmechanismus unterliegen könnten. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde *in vitro* die intrazelluläre Calcium-Konzentration nach BDNF-Applikation in unstimulierten sowie vorstimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen untersucht. Die Auswahl von BDNF als Agonist erfolgte aufgrund der nachgewiesenen, wenn auch geringen TrkA- beziehungsweise TrkC-Rezeptor-Expression in unstimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Für die Analysen wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wie beschrieben aufgereinigt und für 24h in unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Induktion der TrkB-Rezeptor-Expression erfolgte die Zugabe von anti-CD3/CD28-Antikörpern in Standard-Konzentration. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und die Konzentration an freien intrazellulären Calcium-Ionen ( $[Ca^{2+}]_i$ ) nach BDNF-Zugabe in Einzelzell-Messungen wie beschrieben durchgeführt.

In der Anwesenheit von 2 mM extrazellulärem Ca<sup>2+</sup> lag die durchschnittliche Konzentration an intrazellulärem Calcium in unstimulierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (n = 13) bei 21 ± 4,1 nM. Durch die Zugabe von 100 ng/ml BDNF konnte kein Anstieg des intrazellulären Calcium induziert werden (Abb.3.18A). Unstimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen somit keine Sensitivität gegenüber BDNF. Ganz anders reagieren vorstimulierte und somit aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Hier lag die durchschnittliche Konzentration an intrazellulärem Calcium (n = 12) bei 77 ± 26,5 nM (Abb.3.18B). Durch Zugabe von 100 ng/ml BDNF erhöhte sich  $[Ca^{2+}]_i$  auf 250 ± 90,4 nM und verharrte für mindestens 200 sec oszillierend auf diesem Niveau.



**Abbildung 3.18: Induktion einer intrazellulären Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch BDNF in aktivierten  $CD4^+$ -T-Zellen.**  $CD4^+$ -T-Zellen wurden wie beschrieben aus humanem Vollblut isoliert und in Standardmedium (A) beziehungsweise unter Zugabe von anti-CD3/CD28-Antikörpern (B) für 24h kultiviert. Anschließend wurden die Messungen wie in *Material und Methoden* beschrieben durchgeführt. BDNF wurde zu den angegebenen Zeitpunkten appliziert. Die schwarze Linie stellt die durchschnittliche  $[Ca^{2+}]_i$  Konzentration von mindestens 12 Zellen dar. Graue Flächen kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert).

### 3.2.4 Veränderte Cytokin-Produktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Neurotrophine

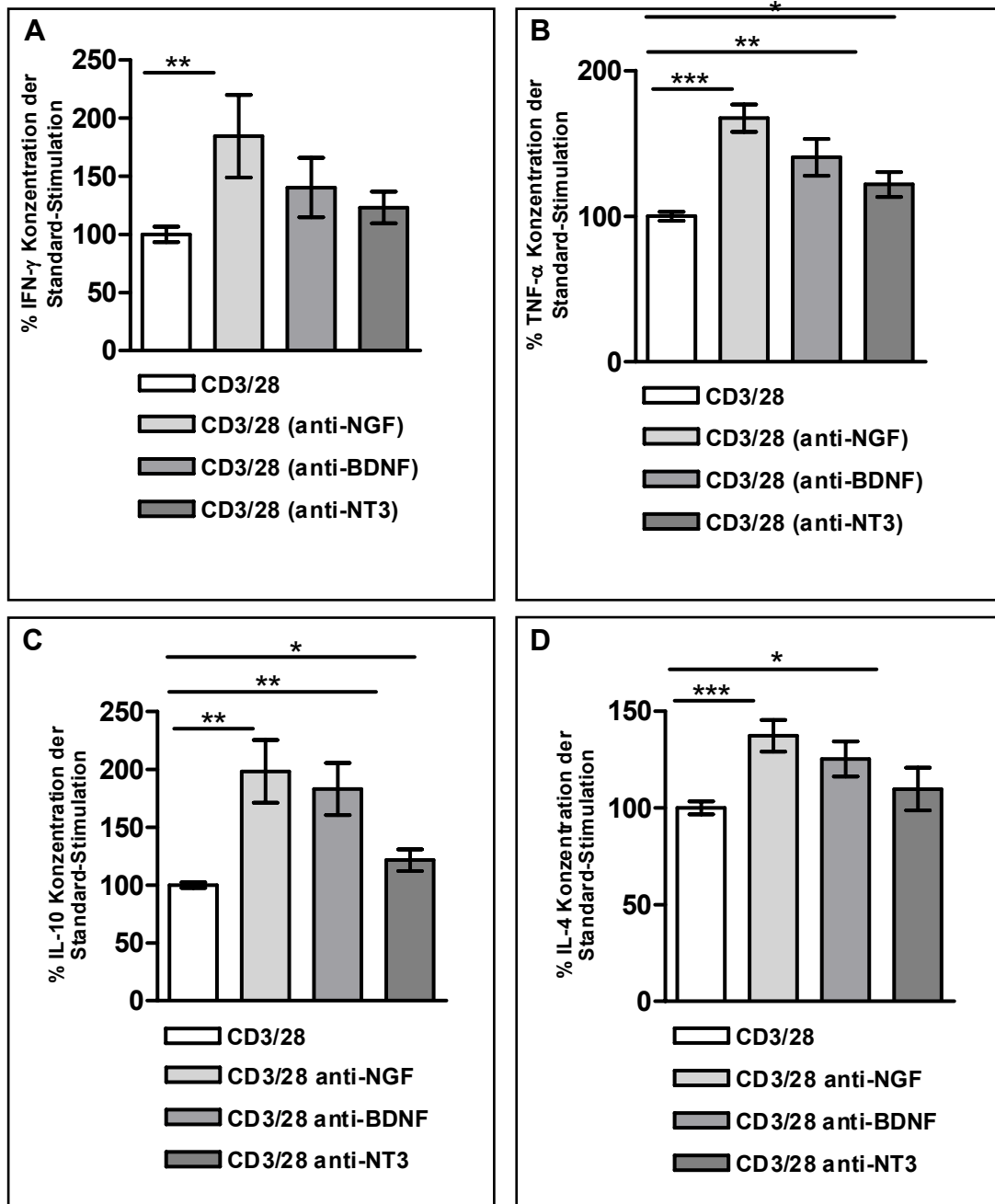
Nachdem gezeigt wurde, dass aktivierte T-Helfer-Zellen Neurotrophin-Rezeptoren differentiell exprimieren und eine direkte Sensitivität der Zellen gegenüber BDNF nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, welche Effekte Neurotrophine auf die Funktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen haben. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde zunächst der Einfluss von Neurotrophinen auf die Cytokin-Produktion von isolierten T-Helferzellen *in vitro* untersucht.

Es sollte sowohl der Einfluss auf die Expression der für TH1-Zellen typischen Cytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) als auch der TH2-Cytokine (IL-4, IL-5, IL-10) untersucht werden. Hierfür wurden isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro* durch anti-CD3/28 Antikörper aktiviert (siehe 2.13) und wie unter 2.13.1 beschrieben durch eine zusätzliche Applikation von anti-Neurotrophin-Antikörpern (anti-NGF, anti-BDNF, anti-NT3) die in der Zellkultur vorhandenen oder produzierten Neurotrophine neutralisiert.

Da die Cytokin-Expression in T-Helfer-Zellen aus unterschiedlichen Spendern nach *in vitro* Stimulation der Zellen mit anti CD3/CD28 Antikörpern stark schwankte, wurde zunächst die durchschnittliche Cytokin-Produktion der T-Zellen eines Spenders ermittelt und dieser Wert als 100% Standard-Stimulation definiert. Der Einfluss der anti-Neurotrophin-Antikörper in % wurde dann auf diesen Wert bezogen (Abb.3.19).

Der deutlichste Effekt wurde durch anti-NGF-Antikörper erzielt. Sowohl die Synthese der TH1-Cytokine IFN- $\gamma$  ( $184,5 \pm 35,48$  %) und TNF- $\alpha$  ( $167,5 \pm 9,43$  %), als auch die Produktion der TH2-Cytokine IL4 ( $198,4 \pm 27,8$  %) und IL-10 ( $137,3 \pm 8,22$ ) war gegenüber der Standard-Stimulation deutlich erhöht.

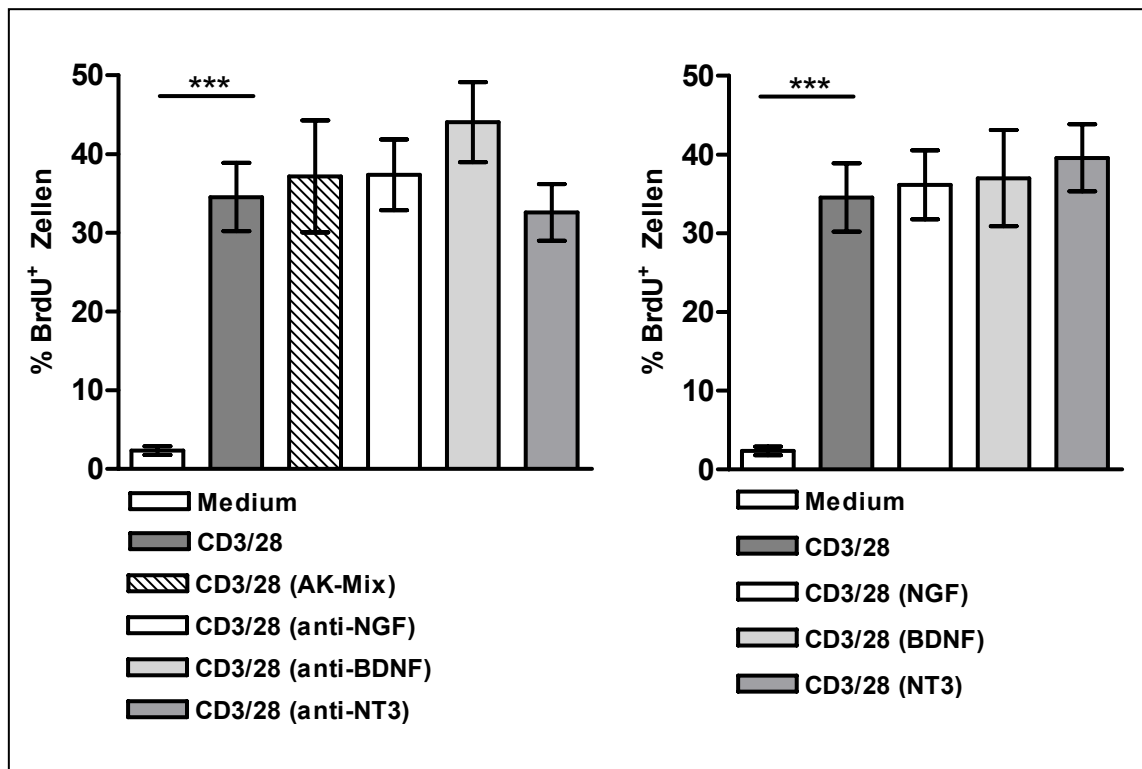
Ähnliche Effekte wurden bei der Applikation von anti-BDNF-Antikörpern beobachtet. Hier kam es zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$  ( $140 \pm 12,63$  %) sowie der IL-10- ( $183,2 \pm 22,57$  %) und der IL-4- ( $125,3 \pm 9,03$  %) Konzentration. Die Zugabe von anti-NT3-Antikörpern führte zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$ - ( $121,8 \pm 8,63$  %) und IL-10- ( $121,6 \pm 9,39$  %) Konzentration. Zusammenfassend kann man sagen, dass die *in vitro* Depletion von Neurotrophinen durch neutralisierende Antikörpern zu einer Erhöhung der TH1- sowie TH2-Cytokin-Produktion nach polyklonaler Aktivierung der Zellen führt.



**Abbildung 3.19: Veränderte Cytokin-Produktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch Neurotrophin-Applikation *in vitro*.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und durch Zugabe von anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Applikation der anti-Neurotrophin-Antikörper: anti-NGF, anti-BDNF oder anti-NT3. Nach 48h wurde die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) und IL-4 (D) im Zellkultur-Überstand mittels *Cytometric Bead Array* ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe der „Students *t*-test“ (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ) durchgeführt.

### 3.2.5 Kein Effekt von Neurotrophinen auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Neben der Cytokin-Produktion ist die Proliferation eine grundlegende Eigenschaft von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. In einem weiteren *in vitro* Experiment wurde der Einfluss von Neurotrophinen auf die Proliferation untersucht. Hierfür wurden wiederum CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus humanem Vollblut gereinigt, unter Standard-Bedingungen kultiviert und durch Zugabe von anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert.



**Abbildung 3.20: Kein Einfluss von Neurotrophinen auf die Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro*.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und durch Zugabe von anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Applikation von Antikörpern gegen Neurotrophine (A): anti-NGF, anti-BDNF, anti-NT3. Beim AK-Mix handelt es sich um eine Mischung von Antikörpern gegen NGF, BDNF, NT3 und NT4 zu gleichen Anteilen (siehe 2.13). NGF, BDNF, NT3 oder Antikörper (B): Dargestellt sind die Ergebnisse von 9 unabhängigen Messungen. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe des „Students *t*-test“ (\*\*\*) durchgeführt.

Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von einzelnen Neurotrophinen beziehungsweise von neutralisierenden anti-Neurotrophin-Antikörpern. In einem weiteren Ansatz wurden durch Zugabe einer Mischung aus TrkA-, TrkB- sowie TrkC-Antikörpern die Signaltransduktion durch Neurotrophine blockiert. Nach Inkubation für 48 h wurde die Proliferation der Zellen wie in *Material und Methoden* beschrieben durch Messung des BrdU-Einbaus bestimmt (Abb.2.20).

Durch die Zugabe von anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern konnte eine deutliche Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induziert werden. Während unstimulierte Zellen nur zu  $2,35 \pm 0,54$  % in der FACS-Messung BrdU-positiv waren, stieg der Anteil in den stimulierten Zellen auf  $34,53 \pm 4,34$  %.

Allerdings konnte die Zugabe einzelner Neurotrophine diese Proliferationsrate nicht erhöhen. Ebenso kam es nach der Applikation einzelner Neurotrophin-Antikörper nicht zu einem Abfall der Proliferationsrate. Interessanterweise hatte auch die Depletion sämtlicher Neurotrophine im Medium durch einen Mix aus Antikörpern gegen NGF, BDNF, NT3 und NT4 keinen Einfluss auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

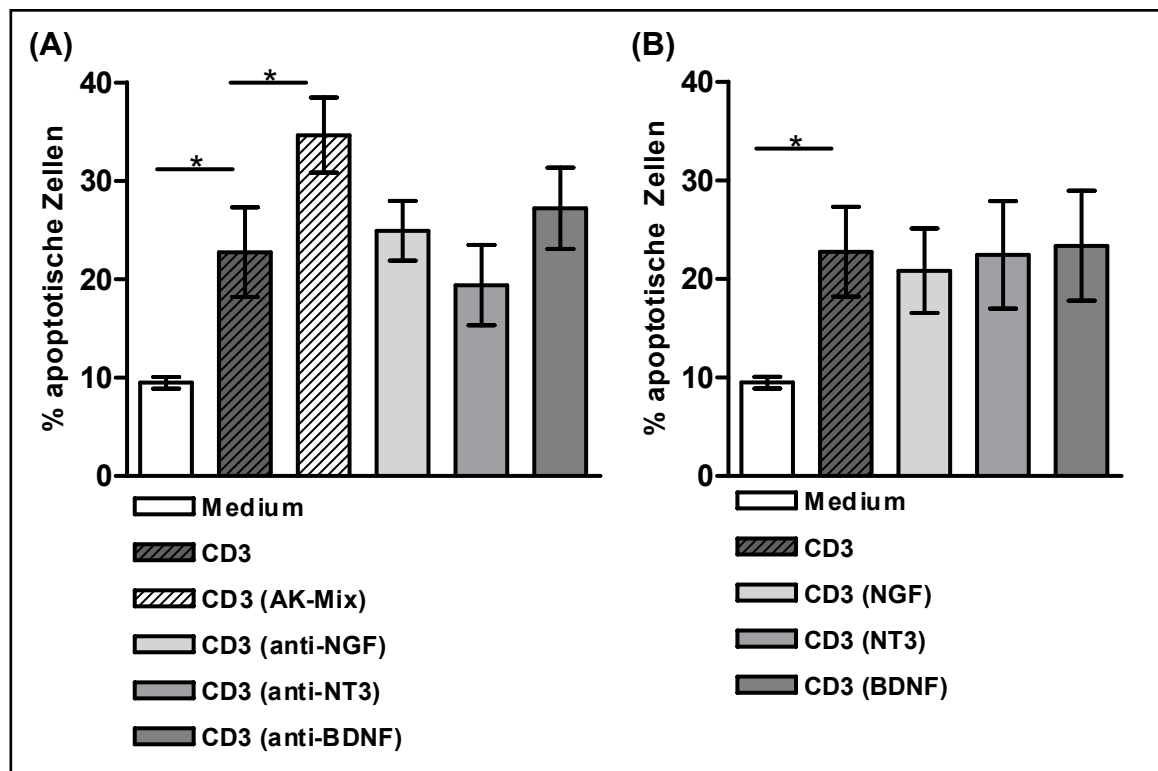
### **3.2.6 Anti-apoptotischer Effekt von Neurotrophinen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro***

Ein weiterer elementarer Bestandteil der *in vivo* Funktion aktivierter T-Zellen ist die Apoptose, also der programmierte Zelltod, im Anschluss an eine Stimulation. Diese Apoptose wird entweder durch erneute Aktivierung induziert, oder erfolgt passiv nach Depletion der Stimuli beziehungsweise Koaktivatoren. Dieses Phänomen kann *in vitro* durch eine entsprechend verlängerte Inkubationszeit im Anschluss an eine polyklonale Aktivierung beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Fragestellung, in wie weit Neurotrophine die T-Zell-Apoptose beeinflussen, wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wie zuvor aufgereinigt und mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert. Wie bei der Proliferations-Analyse wurden entweder einzelne Neurotrophine oder neutralisierende anti-Neurotrophin-Antikörper (einzeln oder als anteilsgleiche Mischung) zugesetzt.

Nach Inkubation für 6 Tage wurde die Apoptose der Zellen wie in *Material und Methoden* beschrieben durch einen Durchfluss-cytometrischen Annexin-V-Assay bestimmt. Durch gleichzeitige Färbung mit dem Vitalitätsfarbstoff 7-AAD wurde zwischen vitalen (Annexin-V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>), apoptotischen (Annexin-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) und toten (Annexin-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) Zellen unterschieden.

Wie zu erwarten, war der Anteil apoptotischer Zellen, nach Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern im Vergleich zur Medium-Kontrolle stark erhöht ( $9,49 \pm 0,59$  % versus  $22,8 \pm 4,6$  % apoptotische Zellen).

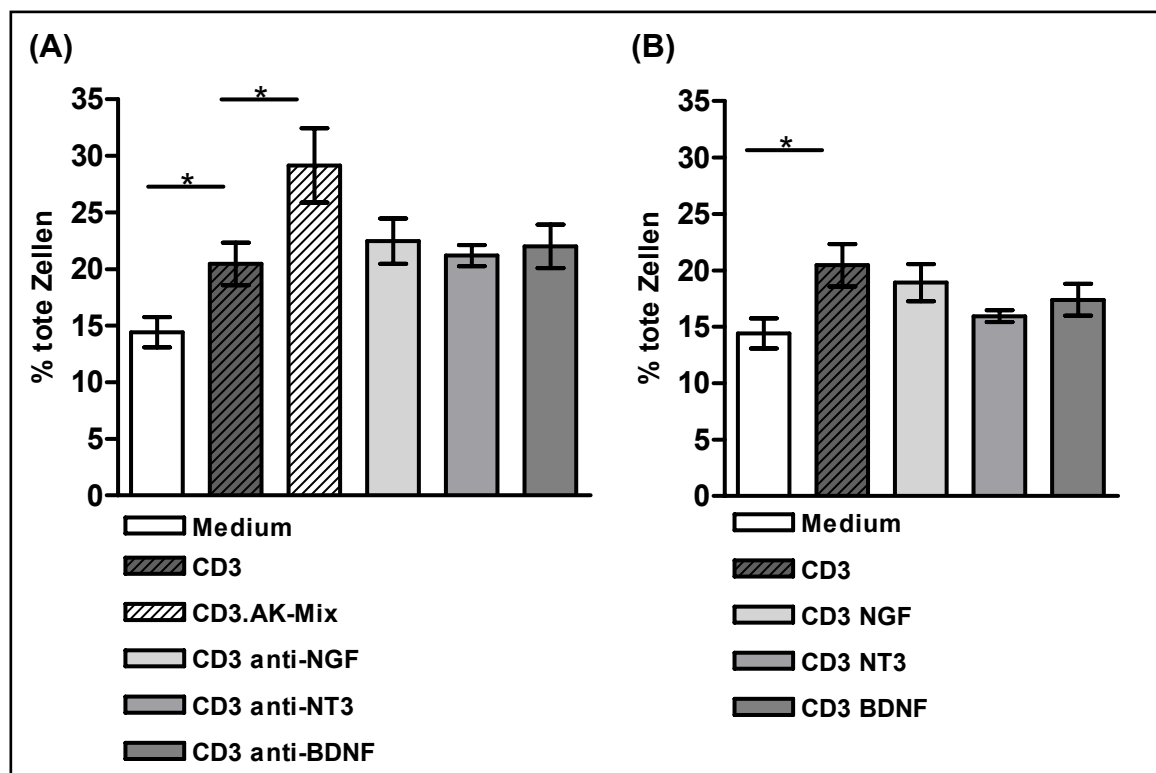


**Abbildung 3.21: Anti-apoptotischer Effekt von Neurotrophinen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro*.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und durch Zugabe von anti-CD3 stimuliert, zusätzlich erfolgte die Applikation von Antikörper gegen (A): NGF, BDNF, NT3 oder eines AK-Mix mit Antikörpern gegen NGF, BDNF, NT3 und NT4 zu gleichen Anteilen (siehe 2.13). In weiteren Ansätzen wurden neben anti-CD3 Antikörpern folgenden Neurotrophine appliziert (B): NGF, BDNF, NT3. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 unabhängigen. Apoptotische Zellen wurden im FACS als 7-AAD<sup>-</sup>/Annexin-V<sup>+</sup> identifiziert. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe des „Students t-test“ (\*p < 0.05) durchgeführt.

Durch Blockade der Neurotrophin-Signaltransduktion durch einen Mix neutralisierender Antikörper gegen NGF, BDNF und NT3 kam es zu einer erneuten Zunahme der apoptotischen Zellen auf  $34,7 \pm 3,8$  % (Abb. 3.21A).

Die Depletion einzelner Neurotrophine hatte indes keine Erhöhung der Apoptoserate zur Folge. Interessanterweise konnte durch die Applikation einzelner Neurotrophine kein zusätzlicher anti-apoptotischer Effekt erzielt werden (Abb.3.21B).

Diese Ergebnisse konnten durch die Analyse der toten Zellen bestätigt werden (Abb.3.22).



**Abbildung 3.22: Einfluss von Neurotrophinen auf das Überleben von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro*.** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie beschrieben gereinigt und durch Zugabe von anti-CD3 stimuliert, zusätzlich erfolgte die Applikation von Antikörper gegen (A): NGF, BDNF, NT3 oder eines AK-Mix mit Antikörpern gegen NGF, BDNF, NT3 und NT4 zu gleichen Anteilen (siehe 2.13). In weiteren Ansätzen wurden neben anti-CD3 Antikörpern folgenden Neurotrophine appliziert (B): NGF, BDNF, NT3. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6 unabhängigen Messungen. Tote Zellen wurden im FACS als 7-AAD<sup>+</sup>/Annexin-V<sup>+</sup> identifiziert. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler des Mittelwerts (=SEM-Wert). Statistische Analysen wurden mithilfe des „Students t-test“ (\*p < 0.05) durchgeführt.

Nach anti-CD3-Zugabe erhöhte sich der Anteil an toten Zellen auf  $20,45 \pm 1.9 \%$  im Vergleich zu  $14.41 \pm 1.3 \%$  in der Medium-Kontrolle. Durch die Applikation des Antikörper-Gemischs kam es zu einer Erhöhung auf  $29,16 \pm 3,3 \%$  tote Zellen (Abb.3.22A). Auch hier hatte weder der Zusatz einzelner neutralisierender Antikörper noch die Applikation einzelner Neurotrophine eine Veränderung der Nekroserate zur Folge.

Es konnte also gezeigt werden, dass die autokrine Synthese von Neurotrophinen einen protektiven Effekt auf die *in vitro* Apoptose von  $CD4^+$ -T-Zellen hat, wobei durch eine zusätzliche Neurotrophin-Applikation keine verstärkte anti-apoptotische Wirkung erzielt werden konnte.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte, in denen die funktionelle Bedeutung von Neurotrophinen auf die Entwicklung und Immunkompetenz von B- sowie T-Lymphocyten untersucht wurde.

Im ersten Teil wurde mit Hilfe eines BDNF-defizienten Mausstamms, der BDNF<sup>-/-</sup>-Maus, die Rolle von BDNF auf die Entwicklung von B- und T-Lymphocyten, sowie die Funktion von murenen B-Lymphocyten untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der differentiellen Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und dem Einfluss von Neurotrophinen auf die Funktion dieser Zellen.

.

### 4.1 Einfluss von BDNF auf die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten in der Maus

Die phänotypische Charakterisierung der BDNF-defizienten Mäuse basiert bisher ausschließlich auf der Beschreibung der gravierenden neuronalen Defizite [Ernfors et al., 1994], während im Rahmen dieser Arbeit erstmals immunologische Aspekte untersucht wurden.

Anhand Durchfluss-cytometrischer Analysen konnte eine signifikante Reduktion der B-Lymphocyten in der Milz sowie im Blut von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden, während keine Unterschiede im Anteil der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Helfer-Zellen) oder der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (cytotoxische T-Zellen) beobachtet wurden. Dieser spezifische B-Zell-Defekt wurde durch Untersuchungen des Knochenmarks bestätigt. Auch hier war der Anteil der B-Zellen in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant niedriger. Durch eine detaillierte Analyse der Entwicklungsstufen der B-Lymphocyten im Knochenmark, ist es gelungen, den beobachteten Entwicklungs-Block auf das Pre-BII-Stadium festzulegen. Somit konnte erstmalig ein spezifischer Einfluss von BDNF auf die B-Lymphopoese mit daraus resultierenden geringeren Anzahlen von B-Lymphocyten in der Peripherie nachgewiesen werden.

Aufgrund des schwerwiegenden Phänotyps der BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse, wie das deutlich niedrigere Gesamtgewicht, die gravierenden motorischen Defizite sowie die geringe Lebenspanne von circa 3 Wochen, erscheint es auf den ersten Blick möglich, dass die reduzierte Anzahl von B-Lymphocyten im Knochenmark und der Peripherie dieser Mäuse nur einen generellen Entwicklungsdefekt der Mäuse reflektiert.

Zahlreiche Argumente sprechen allerdings gegen diese Möglichkeit und unterstreichen einen spezifischen Effekt der BDNF-Depletion auf die B-Zell-Lymphopoese in diesen Mäusen:

1. Die Reifung der B-Lymphocyten im Knochenmark der BDNF<sup>-/-</sup>-Mäuse ist spezifisch im sogenannten Pre-BII-Stadium blockiert.
2. Die Mikroarchitektur der Milz war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht beeinträchtigt.
3. Weder die Verteilung der T-Zell-Entwicklungsstadien im Thymus noch die Anzahl von CD4<sup>+</sup>- beziehungsweise CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz war in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen verändert.

Es ist allgemein akzeptiert, dass die T-Zell-Entwicklung im Thymus einer Regulation durch Cytokine und Wachstumsfaktoren unterliegt, die von Stroma-Zellen produziert werden [Boyd et al., 1993]. Die von Maroder et al. [1996, 2000] publizierten Daten erweiterten das Repertoire der regulatorischen Wechselwirkungen zwischen Stroma-Zellen und Thymocyten um die Neurotrophin-Signaltransduktion über Trk-Rezeptoren, indem sie zeigten, dass durch Stroma-Zellen produziertes BDNF den Zell-Tod immaturer Thymocyten verhindert. Diese Befunde werden durch Untersuchungen bekräftigt, die eine massive Apoptose der Lymphocyten in TrkB-defizienten Mäusen nachweisen [Garcia-Suarez et al., 2002].

Aus diesem Grund wurden im Vorfeld dieser Arbeit erhebliche Defekte hinsichtlich der Entwicklung von T-Zellen in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen postuliert. Überraschenderweise konnten aber weder Veränderungen in der Verteilung von CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> oder CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> Thymocyten-Subpopulationen noch verminderte Anteile von maturen CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden.

Allerdings war die absolute Anzahl von Thymocyten in der BDNF<sup>-/-</sup>-Maus signifikant verringert, so dass ein Einfluss von BDNF auf die Entwicklung von T-Zellen aufgrund der vorliegenden Daten nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Da auch NT-4/5 an den TrkB-Rezeptor bindet, erscheint eine kompensatorische Wirkung durch NT4/5 in diesem Zusammenhang möglich.

Aufgrund der beobachteten deutlichen Reduktion der B-Lymphocyten in den BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen, wurden B-Zell-Lymphopoese und B-Zell-Funktionen in diesen Mäusen näher charakterisiert, während keine genaueren Untersuchungen zur Entwicklung und Funktion von T-Zellen erfolgten.

Die Entwicklung der B-Zellen im Knochenmark von hämatopoetischen Stammzellen in immature B-Zellen kann anhand der Expression spezifischer Marker auf der Zelloberfläche in verschiedene Stadien unterteilt werden. Ausgehend von der Nomenklatur von Melchers und Rolink [Rolink and Melchers, 1996] konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich das Pre-BII-Stadium der B-Zell-Entwicklung von einem Fehlen von BDNF beeinflusst ist, da der Anteil an Pre-BII-Zellen im Knochenmark von BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant reduziert war, während frühere Entwicklungsstadien (Pro-B-Zellen, Pre-BI-Zellen) nicht betroffen waren. Spätere Entwicklungsstadien, wie immature und mature B-Zellen waren dennoch –wenngleich zu einem geringeren Anteil im Knochenmark vorhanden. Diese Tatsache legt nahe, dass die Entwicklungskapazität der B-Zellen abgesehen von dem frühen Entwicklungsblock unbeeinflusst bleibt.

Das von Stromazellen des Knochenmarks produzierte Interleukin-7 ist ein Schlüsselregulator der frühen B-Zell-Entwicklung in der Maus [Namen et al., 1988]. Es wurde gezeigt, dass auch IL-7 defiziente Mäuse einen spezifischen Block beim Übergang von Pro-B ins Pre-B-Zell-Stadium aufweisen [Freedon-Jeffrey et al., 1995]. In Übereinstimmung dazu zeigen Mäuse, die IL-7 überexprimieren eine selektive Expansion der Pre-BII-Zellen [Mertsching et al., 1996]. Somit gleicht der beobachtete Effekt von BDNF auf die B-Zell-Entwicklung in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen dem Effekt von IL-7 in IL-7<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Der Entwicklungsdefekt der B-Zellen in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte indirekt durch eine verminderte Produktion von IL-7 durch die Stroma-Zellen des Knochenmarks verursacht worden sein. Es konnte jedoch kein Unterschied in der IL-7 Expression zwischen kultivierten primären BMCS-Kulturen aus Wildtyp beziehungsweise BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass der beobachtete Defekt in der B-Zell-Entwicklung auf eine „down“-Regulation der IL-7-Expression in BMCS zurückzuführen ist.

Andererseits produzieren diese Zellen eine ganze Reihe von löslichen Faktoren und Cytokinen beispielsweise SDF-1 (*stromal-cell derived factor-1*) [Nagasawa et al., 2000], die in die Entwicklung von hämatopoetischen Zellen involviert sind [Dormady et al., 2001]. Eine mögliche Veränderung dieser Faktoren in BDNF<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde nicht untersucht.

Wahrscheinlicher erscheint jedoch ein synergistischer Effekt von BDNF mit IL-7 oder anderen Cytokinen des hämatopoetischen Mikro-Milieus. So zeigten bereits Untersuchungen von Affray et al. [1996] einen synergistischen Effekt von NGF und SCF (*stem cell factor*) in der wachstumsfördernden Wirkung von MS-5-Zellen auf die hämatopoetische Stammzell-Linie UT-7. Ähnliche Effekte beschreiben auch Kanbe et al. [2000]. Für humane hämatopoetische Zell-Linien wurde ein derartiger synergistischer Effekt auf die zelluläre Proliferation für NGF und M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) gezeigt [Chevalier et al., 1994.]

Als Quelle der Neurotrophine im humanen Knochenmark wurden kürzlich Stromazellen des Knochenmarks (BMSCs) identifiziert [Labouyrie et al., 1999].

In dieser Arbeit wird erstmalig für murine BMSCs, nicht jedoch für ruhende B-Zellen, eine lokale BDNF-Produktion nachgewiesen. Neben BDNF wurde auch die Expression von NGF und NT-3 gezeigt. Der Nachweis einer BDNF-Expression erfolgte sowohl auf mRNA-Ebene als auch durch immunhistochemische Färbungen auf Protein-Ebene. BDNF könnte somit einen direkten parakrinen Effekt auf die B-Zell-Entwicklung im Knochenmark ausüben.

Allerdings, wurde eine Produktion von BDNF bereits für *in vitro* aktivierte B-Zellen nachgewiesen (Edling et al., 2004; Kerschensteiner et al., 1999), womit BDNF unter bestimmten Voraussetzungen auch autokrine Funktionen haben könnte.

Aufgrund der verbreiteten Expression von Trk-Rezeptoren im humanen Knochenmark wurde bereits eine parakrine beziehungsweise autokrine Wirkung von Neurotrophinen auf die Hämatopoese postuliert [Labouyrie et al., 1999].

Wie durch Bracci-Laudiero et al. [2003] gezeigt, exprimieren auch CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut TrkA und NGF. Daneben wurde nachgewiesen, dass NGF das Langzeit-Wachstum von humanen hämatopoetischen Zellen unterstützt [Auffray et al., 1996].

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass NGF und möglicherweise auch andere Neurotrophine als Wachstums-fördernde Cytokine wirken. Diese Hypothese wird auch durch die vorliegende Arbeit unterstützt, in der erstmalig ein Einfluss von BDNF auf die B-Zell-Entwicklung in der Maus nachgewiesen wird, während bisher, abgesehen von wenigen Daten bezüglich einer BDNF- [Laurenzi et al., 1998] beziehungsweise TrkB-Expression [Shibayama und Koizumi 1996; Labouyrie et al., 1999] im Knochenmark, keine konkreten Hinweise auf mögliche Effekte von BDNF auf die Hämatopoese existierten.

Ursprünglich wurde die Expression von TrkB<sub>gp145</sub> ausschließlich für neuronale Zellen beschrieben [Biffo et al., 1995; Wetmore and Olson, 1995]. Neuere Daten weisen allerdings auch auf eine nicht-neuronale Expression hin.

So wurde eine TrkB<sub>gp145</sub>-Expression in EBV (Epstein-Barr Virus)-transformierten humanen B-Lymphocyten nachgewiesen [Schenone et al., 1996]. Da die EBV-Transformation wie ein mitogener Stimulus auf die Zellen wirkt [Klein, 1994], ist anzunehmen, dass letztendlich die proliferative Aktivierung der Zellen zur Rezeptor-Expression führt. Die pathophysiologische Relevanz dieser Ergebnisse wird durch eine Reihe weiterer onkogener Zellen, in denen eine Trk-Expression nachgewiesen wurde, unterstrichen [Nakagawara 2001].

Expressions-Analysen muriner B-Zellen aus Milz und Knochenmark ergaben auch im Rahmen dieser Arbeit keine Hinweise auf die Expression der vollständigen Isoform des BDNF-Rezeptors (TrkB<sub>gp145</sub>) . Interessanterweise konnte aber die Expression der verkürzten Isoform, TrkB<sub>gp95</sub> nachgewiesen werden.

Ursprünglich wurden sämtliche biologische Funktionen von BDNF auf eine Signaltransduktion über den vollständigen BDNF-Rezeptor  $\text{TrkB}_{\text{gp145}}$  zurückgeführt, während man der verkürzten Isoform,  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$ , die Funktion eines negativen Regulators zuschrieb. So wurde gezeigt, dass  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$  entweder über die Bindung und Internalisierung von BDNF [Biffo et al., 1995] oder durch die Dimerisierung mit  $\text{TrkB}_{145}$  [Eide et al., 1996], die Aktivierung dieses Rezeptors verhindert.

Überraschenderweise zeigte sich, dass auch die alleinige  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$ -Expression auf der Zell-Oberfläche mit eigenständigen Funktionen verknüpft ist, wie eine Veränderung der Zell-Morphologie [Haapasalo et al., 1999; Yacoubian & Lo, 2000] oder die Initiierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade nach BDNF-Bindung [Rose et al., 2003] belegen.

Des Weiteren wurde vor kurzem nachgewiesen, dass neben dieser eigenständigen Funktion auch eine  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$ -Signaltransduktion in Kooperation mit den p75-Rezeptor möglich ist [Hartmann et al., 2004].

Neben der Expression von  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$  konnte auch die Expression des pan-Neurotrophin-Rezeptors  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  in murinen B-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten sind vergleichbar mit früheren Untersuchungen, die eine  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -Expression in humanen B-Zellen nachweisen. Interessanterweise zeigte sich, dass eine Signaltransduktion über den  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -Rezeptor nicht ausschließlich im programmierten Zelltod mündet, sondern auch unter bestimmten Voraussetzungen das zelluläre Überleben sogar fördert [DeFreitas et al., 2001; Roux et al., 2001].

Durch die Expression der BDNF-Rezeptoren  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  und  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$  sind murine B-Lymphocyten somit potentiell in der Lage, direkt auf BDNF zu reagieren. Bisher wurde eine derartige funktionelle Relevanz von BDNF in naiven nicht-transformierten B-Lymphocyten allerdings noch nicht nachgewiesen.

Zur Untersuchung der postulierten BDNF-induzierten Signaltransduktion in murinen B-Lymphocyten wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) nach BDNF-Applikation in diesen Zellen gemessen. Sowohl in B-Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert wurden als auch in B-Zellen aus der Milz wurde ein Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration durch BDNF ausgelöst.

Somit konnte erstmalig ein direkter Effekt von BDNF auf B-Zellen nachgewiesen werden.

Allerdings konnte aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht unterschieden werden, ob die zugrunde liegende Signaltransduktionskaskade direkt über  $\text{TrkB}_{\text{gp95}}$  und beziehungsweise oder  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  verläuft, oder ob die beiden Rezeptoren Heterodimere bilden, zumal für beide Rezeptoren in anderen Zell-Systemen gezeigt wurde, dass sie eine Signaltransduktionskaskade mit Calcium-Einstrom nach BDNF-Applikation auslösen [Rose et al., 2003].

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Depletion von BDNF in der Maus zu einem spezifischen Immundefekt innerhalb der B-Zell-Entwicklung führt. Dies weist auf eine fundamentale Rolle von BDNF innerhalb der B-Zell-Lymphopoese hin. Die Tatsache, dass mesenchymale Stroma-Zellen des Knochenmarks eine deutliche BDNF-Expression aufweisen, und B-Zellen BDNF-Rezeptoren exprimieren, die durch eine BDNF-Applikation aktiviert werden, verdeutlicht die Rolle von BDNF als integrales Molekül des Immunsystems.

Nachdem anhand des Modells der  $\text{BDNF}^{-/-}$ -Maus gezeigt werden konnte, dass BDNF für spezifische Aspekte der B-Zell-Lymphopoese von entscheidender Bedeutung ist, ergaben sich eine Reihe weiterer Fragestellungen, beispielsweise wie BDNF oder andere Neurotrophine auf die Funktion beziehungsweise das Überleben von reifen Lymphocyten wirkt.

Hier offenbarten sich die Limitierungen des gewählten Maus-Modells. Aufgrund des gravierenden Phänotyps der Mäuse, war es weder möglich, ausreichende Mengen an maturen Lymphocyten für *in vitro* Versuche zu gewinnen noch mit Hilfe von *in vivo* Versuchen immunologische Reaktionen zu untersuchen.

Die Verwendung eines konditionellen Knock-out-Mausmodells, basierend auf dem Cre-Lox-System, wäre sicherlich eine Möglichkeit gewesen, diese Limitierungen zu umgehen. So sind sowohl Mäuse käuflich erwerbbar (Jackson Laboratory), bei denen das BDNF- oder das NT3-Gen von sogenannten *lox-P-sites* flankiert ist, als auch eine Reihe von transgenen Mäusen, bei denen die Expression der Cre-

Rekombinase durch gewebespezifische oder induzierbare Promotoren erfolgt. Dadurch ist es möglich, entweder zeit- oder gewebespezifisch, die Neurotrophin-Expression zu verhindern und somit unerwünschte sekundäre Effekte, die durch die „klassische“ Wirkung von Neurotrophinen auf Zellen des Nervensystems verursacht werden, zu umgehen.

Dennoch wurde dieses Modell nicht für weitere Untersuchungen ausgewählt, da die Etablierung und Charakterisierung eines neuen Mausmodells den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit überschritten hätte.

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit, der Einfluss von BDNF auf die Entwicklung und Funktion von B-Lymphocyten untersucht wurde, sollten im Weiteren die Effekte von Neurotrophinen auf T-Lymphocyten untersucht werden.

Da bereits eine Reihe von Daten auf die Bedeutung von Neurotrophinen innerhalb T-Zell-vermittelter immunologischer Erkrankungen, wie Allergien oder Autoimmun-Erkrankungen hinweisen, wurde zur Untersuchung dieser Fragestellung ein *In-vitro*-Modell mit peripheren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausgewählt.

#### **4.2 Funktionelle Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen ist die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand humaner T-CD4<sup>+</sup>-Zellen. Nach polyklonaler Stimulation isolierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene die Induktion (TrkB, TrkC) beziehungsweise eine deutliche Erhöhung der Rezeptor-Expression (TrkA) nachgewiesen werden.

Diese Daten fügen sich in bisherige Befunde ein, in denen bereits eine Aktivierungs-abhängige Expression von Trk-Rezeptoren beschrieben wurde. Allerdings basieren diese Untersuchungen entweder auf der Analyse von Zell-Linien oder spezifischer T-Zell-Klone. Hier wurde die Expression von TrkA [Ehrhard et al., 1993, Maroder et al., 1996] und TrkC [Sekimoto et al., 2003] präferentiell in Th2-Zellen nachgewiesen, während die Expression von TrkB<sub>gp145</sub> selektiv für Th1-Zellen gezeigt wurde [Besser und Wank 1999].

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der eine Expression von p75-mRNA sowohl in stimulierten als auch in unstimulierten T-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde bisher in T-Zellen eine p75 Expression ausgeschlossen [Ehrhard et al., 1993]. Eine Erklärung hierfür ist wahrscheinlich die Verwendung von Langzeit-Zell-Klonen durch Ehrhard et al., da diese Kulturen nur sehr bedingt die physiologische Situation reflektieren und somit nicht direkt mit den hier gezeigten Untersuchungen vergleichbar sind.

Im Weiteren wurde der Frage nachgegangen, inwiefern die beobachtete Rezeptor-Expression mit der Expression der korrespondierenden Neurotrophine einhergeht. Hierfür wurde die Konzentration von NGF, BDNF sowie NT3 in Zellkultur-Überständen stimulierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestimmt. Eine deutliche Expression konnte sowohl für NGF als auch für NT3, nicht jedoch für BDNF nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Expression verschiedener Neurotrophine bei unterschiedlichen Aktivierungs-Zuständen bereits durch mehrere Arbeitsgruppen belegt wurde [Ehrhard et al., 1993; Ehrhard et al., 1994; Lambiase et al., 1997; Besser und Wank 1999; Braun et al., 1999; Kerschensteiner et al., 1999; Moalem et al., 2000], verfestigt die Hypothese einer präzisen regulierten Aktivierungs-abhängigen Neurotrophin-Expression in diesen Zellen. Die simultane Expression von NGF und TrkA [Ehrhard et al., 1993] in identischen Zell-Klonen suggeriert zudem einen autokrinen Wirkmechanismus.

Dennoch sind auch parakrine Wirkungen möglich, da zahlreiche andere Immunzellen, wie B-Zellen [Santambrogio et al., 1994; Torcia et al., 1996; Besser und Wank 1999], Monocyten/Macrophagen [Schober et al., 1998; Besser und Wank 1999; Braun et al., 1999; Caroleo et al., 2001] und Granulozyten [Laurenzi et al., 1998], sowie Epithel-Zellen [Hahn et al., 2006] Neurotrophine produzieren [siehe auch Tabelle 1.1].

Obwohl bereits, wie oben beschrieben, zahlreiche Daten über eine Neurotrophin beziehungsweise NT-Rezeptor-Expression vorliegen, fehlen bisher Belege für unmittelbare Effekte von Neurotrophinen auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmal der Nachweis einer direkten Reaktivität dieser Zellen auf ein Neurotrophin. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gereinigt und durch anti-

CD3/CD28 polyklonal stimuliert, was wahrscheinlich eine Induktion der Trk-Rezeptor Expression bewirkt.

Durch Zugabe von BDNF konnte in derart vorstimulierten Zellen ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induziert werden, während unbehandelte  $CD4^+$ -T-Zellen nicht auf eine BDNF-Zugabe reagierten. Durch die Aktivierung der Zellen wird also die Expression eines funktionellen BDNF-Rezeptors induziert.

Die Beobachtung, dass eine Aktivierung  $CD4$ -positiver T-Zellen die Expression von Neurotrophinen und ihren korrespondierenden funktionellen Trk-Rezeptoren induziert, führte zu der Überlegung, in wiefern diese Expression für die Funktion dieser Zellen relevant ist.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden typische immunologische Parameter aktivierter  $CD4^+$ -T-Zellen untersucht. Durch Zugabe von Neurotrophinen beziehungsweise neutralisierenden Antikörpern gegen Neurotrophine wurde der Einfluss von NTs auf die verschiedenen Parameter untersucht. Im Einzelnen waren dies: Cytokin-Produktion, Proliferation sowie Apoptose der Zellen.

Hinsichtlich der Cytokin-Produktion ergaben sich überraschende Ergebnisse. Hier kam es durch die Depletion von, durch  $CD4^+$ -T-Zellen produzierten oder im Medium vorhanden, Neurotrophinen mittels neutralisierender Antikörper nicht (wie erwartet) zu einer Erniedrigung der Cytokin-Synthese sondern zu einem Anstieg.

Dieser Anstieg der Cytokin-Produktion betraf sowohl Cytokine, die für Th1-Zellen typisch sind (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), als auch Th2-Cytokine (IL-4; IL-10). Die deutlichsten Effekte wurden hierbei durch anti-NGF-Antikörper erzielt.

Diese Ergebnisse sind insofern überraschend, als bisherige Befunde ausschließlich eine Neurotrophin-induzierte Erhöhung der Produktion oder Ausschüttung von Mediatoren durch immunologische Zellen belegen. Beispiele sind hierfür: die erhöhte Produktion von IL-1 $\beta$  [Susaki et al., 1996] und TNF- $\alpha$  [Barouch et al., 2001] durch Monocyten / Macrophagen, die Superoxid-Produktion durch neutrophile Granulozyten [Kannan et al., 1991] und die Produktion von Lipid-Mediatoren [Bischoff und Dahinden 1992; Burgi et al., 1993] / IL-13 [Sin et al., 2001] in basophilen Granulozyten.

Im Gegensatz zu anderen immunologischen Zellen scheinen Neurotrophine in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen somit eher einen modulierenden beziehungsweise hemmenden Einfluss auf die Cytokin-Produktion zu haben.

Ein weiterer typischer Parameter aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist die Proliferation der Zellen. In einem *in vitro* Experiment, bei dem der Einbau von BrdU (Bromdesoxyuridin) in neu synthetisierte DNA nach polyklonaler Stimulation der Zellen durch anti-CD3-CD28-Antikörper untersucht wurde, sollte der Einfluss von Neurotrophinen auf diesen Parameter untersucht werden. Weder die Zugabe einzelner Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3) noch die Depletion der Neurotrophine durch neutralisierende Antikörper (anti-NGF, anti-BDNF, anti-NT3) hatte einen Einfluss auf die Proliferationsrate. Um auszuschließen, dass durch die Depletion eines Neurotrophins gewissermaßen eine Kompensation durch ein anderes Neurotrophin erfolgt, wurde einem weiteren Ansatz die gesamte Neurotrophin-Signaltransduktion durch einen Antikörper-Mix (anti-NGF, anti-BDNF, anti-NT3, anti-NT4) unterbunden. Auch hier war kein Effekt erkennbar.

Demnach scheinen Neurotrophine innerhalb der hier gewählten *in-vitro* Bedingungen keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen zu haben. Allerdings erfolgt durch die Applikation von anti-CD3/CD28-Antikörpern bereits eine maximale Aktivierung der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, so dass ein positiver Effekt durch Neurotrophine überdeckt werden könnte.

Des Weiteren sprechen auch Daten anderer Arbeitsgruppen eher für eine verstärkende Wirkung der Neurotrophine auf die zelluläre Proliferation unter suboptimalen Aktivierungsbedingungen.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine NGF-Applikation zu einer erhöhten [<sup>3</sup>H] Thymidin-Aufnahme in stimulierten Splenocyten der Ratte führt, wenn diese Zellen mit suboptimalen Dosen spezifischer B-Zell-(Lipopolysaccharid) beziehungsweise T-Zell-Mitogene (Concanavalin A, Phytohämagglutinin) inkubiert wurden [Thorpe und Perez-Polo 1987]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Brodie und Gelfand [1992]. Sie konnten zeigen, dass NGF den mitogenen Effekt von SAC (Extrakt aus *Staphylococcus aureus* Cowan1) auf periphere B-Zellen steigert. Interessanterweise wurde dieser Effekt durch IL-2 nicht jedoch durch IL-4 verstärkt.

Bereits im 1. Abschnitt der Diskussion wurde erörtert, dass Neurotrophine die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen häufig in Synergie mit bereits charakterisierten Wachstumsfaktoren fördern und somit nicht isoliert wirken. Es erscheint wahrscheinlich, dass ein derartiges modulierendes Eingreifen der Neurotrophine in immunologische Signalkreise auch bei der Aktivierung und Proliferation von CD4-T-Zellen vorliegt.

Von entscheidender Bedeutung für eine funktionierende Immun-Homöostase ist neben den oben diskutierten T-Zell-Charakteristika wie Aktivierung, Proliferation und Cytokin-Produktion auch das Abklingen der T-Zell-Antworten, nachdem das Antigen eliminiert wurde. Dieses „Zurückfahren“ der T-Zell-vermittelten Immunantwort wird hauptsächlich durch die Apoptose der Antigen-aktivierten T-Zellen vermittelt.

Der Einfluss von Neurotrophinen auf die Apoptose aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde innerhalb dieser Arbeit in einem *in vitro* Ansatz untersucht. Hierfür wurden gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen polyklonal durch Zugabe von anti-CD3-Antikörpern stimuliert und die Apoptose der Zellen nach 6 Tagen durch einen Durchfluss-cytometrischen Annexin-V-Assay bestimmt. Durch gleichzeitige Färbung der Zellen mit dem Vitalitätsfarbstoff 7-AAD wurde sowohl der Anteil apoptotischer (Annexin-V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>) als auch der Anteil toter (Annexin-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) Zellen bestimmt. Im Vergleich zur Medium-Kontrolle wurde in den durch anti-CD3-Antikörper stimulierten Zellen eine deutlich erhöhte Apoptose-Rate induziert.

In dieser Arbeit konnte auch erstmalig gezeigt werden, dass die Depletion der Neurotrophine (NGF, BDNF, NT3, NT4) durch einen Mix neutralisierender Antikörper gegen diese Neurotrophine die Apoptose-Rate nochmals deutlich erhöht. Neurotrophine üben somit einen protektiven Einfluss auf das Überleben der Zellen aus. Dieser Effekt konnte weder durch die isolierte Depletion einzelner Neurotrophine erzielt werden, noch konnte ein gegenteiliger Effekt durch eine zusätzliche Neurotrophin-Applikation induziert werden.

Da weiterhin in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Neurotrophine produzieren und ins Neurotrophin-freie Medium abgeben, liegt die Überlegung nahe, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen Neurotrophine als autokrine Überlebensfaktoren produzieren.

Ein derartiger autokriner Neurotrophin-Effekt auf das Überleben der Zellen wurde innerhalb des Immunsystems bisher ausschließlich für NGF als Überlebensfaktor für Memory-B-Zellen [Torcia et al., 1996] sowie HIV-infizierte Macrophagen [Garaci et al., 1999] nachgewiesen. Allerdings gibt es eine ganze Reihe von Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass die *in vitro* Applikation von NGF das Überleben von Immunzellen, beispielsweise von Mastzellen [Horigome et al., 1994; Kawamoto et al., 1995; Bullock et al., 1996 ], Monocyten [La Sala et al., 2000], Neutrophilen [Kannan et al., 1991, 1992; ], Basophilen [Miura et al., 2001] oder Eosinophilen [Hamada et al., 1996] fördert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte also eine aktivierungsabhängige Expression von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren in humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen werden. Durch die Modulation der Cytokin-Produktion sowie ihre anti-apoptotische Wirkung wurden Neurotrophine als integrale Regulatoren des Immunsystems charakterisiert, die ähnlich den „klassischen“ Cytokinen wirken.

## 5. Zusammenfassung

Seit der initialen Charakterisierung von Neurotrophinen als wachstumsfördernde Faktoren für sich entwickelnde und mature neuronale Zellpopulationen ist das Spektrum bekannter Zielzellen und Funktionen gewaltig expandiert. Vor allem die Rolle von Neurotrophinen als Modulatoren der Immunfunktion wurde innerhalb der letzten Jahre gut untersucht. Allerdings basiert die überwiegende Mehrzahl der bisherigen Daten auf Untersuchungen, die sich ausschließlich mit der Rolle von NGF, dem „Prototyp“ der Neurotrophine, beschäftigten. Der Einfluss von BDNF, NT3 oder NT4-5 wurde in dieser Hinsicht weit weniger gut untersucht.

Zwar gibt es eine Reihe von Daten, die eine vielfältige Expression von Neurotrophinen und ihren Rezeptoren in den unterschiedlichsten Immunzellen nachweisen. Demgegenüber sind die konkreten physiologischen Bedingungen der Neurotrophin/NT-Rezeptor-Expression sowie die funktionelle Relevanz nur ansatzweise verstanden.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von Neurotrophinen auf zwei unterschiedliche Aspekte des Immunsystems.

Im **ersten Teil** dieser Arbeit wurde die Rolle von BDNF innerhalb der Entwicklung muriner B-Zellen anhand eines „knock-out“-Maus-Modells, der BDNF<sup>-/-</sup>-Maus, untersucht. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Depletion von BDNF in der Maus zu einem spezifischen Immundefekt innerhalb der B-Zell-Entwicklung führt, da der Anteil der sogenannten Prä-BII-Zellen sowie die Anteile aller nachfolgenden Entwicklungsstadien in diesen Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich reduziert war. Dies weist auf eine fundamentale Rolle von BDNF innerhalb der B-Zell-Lymphopoese hin.

Durch Untersuchungen der mesenchymalen BDNF-Expression in Stroma-Zellen des Knochenmarks sowie der Expression von BDNF-Rezeptoren in B-Zellen ergaben sich erstmals Hinweise auf parakrine BDNF-Signalwege innerhalb der B-Zell-Entwicklung.

Diese Überlegung wird unterstützt durch den Nachweis der direkten Stimulation von B-Zellen durch eine BDNF-Applikation, die in einer Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) mündete.

Im **zweiten Teil** dieser Arbeit wurde der Einfluss von Neurotrophinen auf die Funktion von humanen  $CD4^+$ -T-Zellen untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von Trk-Rezeptoren in diesen Zellen durch die polyklonale Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern induziert beziehungsweise deutlich erhöht wird. Interessanterweise konnte in derart vorstimulierten Zellen ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) durch BDNF-Applikation induziert werden, während unbehandelte  $CD4^+$ -T-Zellen nicht auf eine BDNF-Zugabe reagierten. Dies ist der erste Nachweis einer direkten Stimulation der Zellen nach BDNF-Applikation.

Weitere Untersuchungen belegen die physiologische Relevanz dieser Beobachtung. So konnte neben einem modulierenden beziehungsweise hemmenden Einflusses von Neurotrophinen auf die Cytokin-Produktion in  $CD4^+$ -T-Zellen, ein protektiver Effekt von Neurotrophinen auf das Überleben polyklonal stimulierter  $CD4^+$ -T-Zellen nachgewiesen werden.

Da außerdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass aktivierte  $CD4^+$ -T-Zellen Neurotrophine produzieren und ins Medium abgeben, erscheint es wahrscheinlich, dass  $CD4^+$ -T-Zellen Neurotrophine als autokrine Überlebensfaktoren produzieren.

Zusammenfassend verdeutlichen die hier vorgelegten Ergebnisse die weitreichenden Effekte von Neurotrophinen als integrale Moleküle des Immunsystems. Es konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine durch Immunzellen ( $CD4^+$ -T-Zellen) beziehungsweise Strukturzellen immunologischer Organe (Stromazellen des Knochenmarks) produziert werden und Wirkungen innerhalb des Immunsystems entfalten, die den „klassischen“ Cytokinen ähneln. Hervorzuheben sind hierbei anti-apoptotische Wirkungen von Neurotrophinen, als autokrine Überlebensfaktoren für  $CD4^+$ -T-Zellen sowie als parakrine Wachstumsfaktoren innerhalb der Lymphopoese von B-Zellen.

## 6. Literatur

K. **Aalto**, L. Korhonen, P. Lahdenne, P. Pelkonen, and D. Lindholm. Nerve growth factor in serum of children with systemic lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 20 (3):136-139, 2002.

G. V. **Abramchik**, S. S. Yermakova, V. N. Kaliunov, R. M. Tanina, and M. K. Tumilovich. The immunomodulatory effect of nerve growth factor. *J.Neurosci.Res.* 19 (3):349-356, 1988.

S. **Abramson**, R. G. Miller, and R. A. Phillips. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J.Exp.Med.* 145 (6):1567-1579, 1977.

L. **Aloe** and R. LEVI-MONTALCINI. Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res.* 133 (2):358-366, 1977.

L. **Aloe**, E. Alleva, A. Bohm, and R. LEVI-MONTALCINI. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 (16):6184-6187, 1986.

R. S. **Aloyz**, S. X. Bamji, C. D. Pozniak, J. G. Toma, J. Atwal, D. R. Kaplan, and F. D. Miller. p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J.Cell Biol.* 143 (6):1691-1703, 1998.

G. **Anderson**, B. C. Harman, K. J. Hare, and E. J. Jenkinson. Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin.Immunol.* 12 (5):457-464, 2000.

J. C. **Arevalo** and S. H. Wu. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol.Life Sci.* 63 (13):1523-1537, 2006.

J. K. **Atwal**, B. Massie, F. D. Miller, and D. R. Kaplan. The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and P13-kinase. *Neuron* 27 (2):265-277, 2000.

- I. **Auffray**, S. Chevalier, J. Froger, B. Izac, W. Vainchenker, H. Gascan, and L. Coulombel. Nerve growth factor is involved in the supportive effect by bone marrow--derived stromal cells of the factor-dependent human cell line UT-7. *Blood* 88 (5):1608-1618, 1996.
- S. X. **Bamji**, M. Majdan, C. D. Pozniak, D. J. Belliveau, R. Aloyz, J. Kohn, C. G. Causing, and F. D. Miller. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J.Cell Biol.* 140 (4):911-923, 1998.
- M. **Barbacid**. The Trk family of neurotrophin receptors. *J.Neurobiol.* 25 (11):1386-1403, 1994.
- M. **Barbacid**. Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 766:442-458, 1995.
- Y. A. **Barde**, A. M. Davies, J. E. Johnson, R. M. Lindsay, and H. Thoenen. Brain derived neurotrophic factor. *Prog.Brain Res.* 71:185-189, 1987.
- P. A. **Barker**. p75NTR: A study in contrasts. *Cell Death.Differ.* 5 (5):346-356, 1998.
- P. J. **Barnes**. Neurogenic inflammation in the airways. *Respir.Physiol* 125 (1-2):145-154, 2001.
- R. **Barouch**, E. Appel, G. Kazimirsky, and C. Brodie. Macrophages express neurotrophins and neurotrophin receptors. Regulation of nitric oxide production by NT-3. *J.Neuroimmunol.* 112 (1-2):72-77, 2001.
- G. L. **Barrett** and P. F. Bartlett. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (14):6501-6505, 1994.
- G. T. **Baxter**, M. J. Radeke, R. C. Kuo, V. Makrides, B. Hinkle, R. Hoang, A. Medina-Selby, D. Coit, P. Valenzuela, and S. C. Feinstein. Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J.Neurosci.* 17 (8):2683-2690, 1997.

L. R. **Berkemeier**, J. W. Winslow, D. R. Kaplan, K. Nikolics, D. V. Goeddel, and A. Rosenthal. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7 (5):857-866, 1991.

M. **Besser** and R. Wank. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors. *J.Immunol.* 162 (11):6303-6306, 1999.

S. **Biffo**, N. Offenhauser, B. D. Carter, and Y. A. Barde. Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121 (8):2461-2470, 1995.

L. G. **Billips**, D. Petite, K. Dorshkind, R. Narayanan, C. P. Chiu, and K. S. Landreth. Differential roles of stromal cells, interleukin-7, and kit-ligand in the regulation of B lymphopoiesis. *Blood* 79 (5):1185-1192, 1992.

S. C. **Bischoff** and C. A. Dahinden. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79 (10):2662-2669, 1992.

M. **Bothwell**. Evolution of the neurotrophin signaling system in invertebrates. *Brain Behav.Evol.* 68 (3):124-132, 2006.

R. L. **Boyd**, C. L. Tucek, D. I. Godfrey, D. J. Izon, T. J. Wilson, N. J. Davidson, A. G. Bean, H. M. Ladyman, M. A. Ritter, and P. Hugo. The thymic microenvironment. *Immunol.Today* 14 (9):445-459, 1993.

M. D. **Boyle**, M. J. Lawman, A. P. Gee, and M. Young. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J.Immunol.* 134 (1):564-568, 1985.

L. **Bracci-Laudiero**, D. Celestino, G. Starace, A. Antonelli, A. Lambiase, A. Procoli, C. Rumi, M. Lai, A. Picardi, G. Ballatore, S. Bonini, and L. Aloe. CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. *J.Neuroimmunol.* 136 (1-2):130-139, 2003.

H. F. **Bradford**, J. Zhou, B. Pliego-Rivero, G. M. Stern, and E. Jauniaux. Neurotrophins in the pathogenesis and potential treatment of Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 80:19-25, 1999.

A. **Braun**, M. Lommatzsch, A. Mannsfeldt, U. Neuhaus-Steinmetz, A. Fischer, N. Schnoy, G. R. Lewin, and H. Renz. Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 21 (4):537-546, 1999.

C. **Brodie** and E. W. Gelfand. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J.Immunol.* 148 (11):3492-3497, 1992.

C. **Brodie**, A. Oshiba, H. Renz, K. Bradley, and E. W. Gelfand. Nerve growth-factor and anti-CD40 provide opposite signals for the production of IgE in interleukin-4-treated lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 26 (1):171-178, 1996.

E. D. **Bullock** and E. M. Johnson, Jr. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. *J.Biol.Chem.* 271 (44):27500-27508, 1996.

B. **Burgi**, U. H. Otten, B. Ochensberger, S. Rihs, K. Heese, P. B. Ehrhard, C. F. Ibanez, and C. A. Dahinden. Basophil priming by neurotrophic factors. Activation through the trk receptor. *J.Immunol.* 157 (12):5582-5588, 1996.

M. C. **Caroleo**, N. Costa, L. Bracci-Laudiero, and L. Aloe. Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J.Neuroimmunol.* 113 (2):193-201, 2001.

B. D. **Carter**, C. Kaltschmidt, B. Kaltschmidt, N. Offenhauser, R. Bohm-Matthaei, P. A. Baeuerle, and Y. A. Barde. Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272 (5261):542-545, 1996.

M. V. **Chao**. The p75 neurotrophin receptor. *J.Neurobiol.* 25 (11):1373-1385, 1994.

M. V. **Chao** and M. Bothwell. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 33 (1):9-12, 2002.

J. **Chen** and F. W. Alt. Gene rearrangement and B-cell development. *Curr.Opin.Immunol.* 5 (2):194-200, 1993.

S. **Chevalier**, V. Praloran, C. Smith, D. MacGrogan, N. Y. Ip, G. D. Yancopoulos, P. Brachet, A. Pouplard, and H. Gascan. Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells. *Blood* 83 (6):1479-1485, 1994.

J. M. **Chirgwin**, A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (24):5294-5299, 1979.

E. A. **Clark** and J. A. Ledbetter. How B and T cells talk to each other. *Nature* 367 (6462):425-428, 1994.

S. **Cohen** and R. Levi-Montalcini. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 42 (9):571-574, 1956.

M. **D'Onofrio**, U. de Grazia, S. Morrone, L. Cuomo, P. Spinsanti, L. Frati, A. Gulino, and G. Ragona. Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur.Cytokine Netw.* 11 (2):283-291, 2000.

A. **de Vries**, M. C. Dessing, F. Engels, P. A. Henricks, and F. P. Nijkamp. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor-mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 159 (5 Pt 1):1541-1544, 1999.

A. **de Vries**, C. van Rijnsoever, F. Engels, P. A. Henricks, and F. P. Nijkamp. The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. *Br.J.Pharmacol.* 134 (4):771-776, 2001.

A. **de Vries**, F. Engels, P. A. Henricks, T. Leusink-Muis, G. P. McGregor, A. Braun, D. A. Groneberg, M. C. Dessing, F. P. Nijkamp, and A. Fischer. Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clin.Exp.Allergy* 36 (9):1192-1200, 2006.

M. F. **DeFreitas**, P. S. McQuillen, and C. J. Shatz. A novel p75<sup>NTR</sup> signaling pathway promotes survival, not death, of immunopurified neocortical subplate neurons. *J.Neurosci.* 21 (14):5121-5129, 2001.

E. **Dicou**, C. Masson, W. Jabbour, and V. Nerriere. Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 5 (3):321-324, 1993.

J. **Donnerer**, R. Schuligoi, and C. Stein. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 49 (3):693-698, 1992.

S. P. **Dormady**, O. Bashayan, R. Dougherty, X. M. Zhang, and R. S. Basch. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J.Hematother.Stem Cell Res.* 10 (1):125-140, 2001.

T. **Ebendal**. NGF in CNS: experimental data and clinical implications. *Prog.Growth Factor Res.* 1 (3):143-159, 1989.

A. E. **Edling**, T. Nanavati, J. M. Johnson, and V. K. Tuohy. Human and murine lymphocyte neurotrophin expression is confined to B cells. *J.Neurosci.Res.* 77 (5):709-717, 2004.

P. B. **Ehrhard**, P. Erb, U. Graumann, and U. Otten. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 90 (23):10984-10988, 1993.

P. B. **Ehrhard**, U. Ganter, A. Stalder, J. Bauer, and U. Otten. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 90 (12):5423-5427, 1993.

P. B. **Ehrhard**, P. Erb, U. Graumann, B. Schmutz, and U. Otten. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J.Immunol.* 152 (6):2705-2709, 1994.

F. F. **Eide**, E. R. Vining, B. L. Eide, K. Zang, X. Y. Wang, and L. F. Reichardt. Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J.Neurosci.* 16 (10):3123-3129, 1996.

P. **Ernfors**, K. F. Lee, and R. Jaenisch. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 368 (6467):147-150, 1994.

D. **Esposito**, P. Patel, R. M. Stephens, P. Perez, M. V. Chao, D. R. Kaplan, and B. L. Hempstead. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. *J.Biol.Chem.* 276 (35):32687-32695, 2001.

M. **Fahnestock**, G. Yu, and M. D. Coughlin. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule? *Prog.Brain Res.* 146:101-110, 2004.

F. **Falcini**, Cerinic M. Matucci, A. Lombardi, S. Generini, A. Pignone, P. Tirassa, M. Ermini, L. Lepore, G. Partsch, and L. Aloe. Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 55 (10):745-748, 1996.

D. L. **Felten**. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. *Neuropsychobiology* 28 (1-2):110-112, 1993.

B. J. **Fowlkes** and E. Schweighoffer. Positive selection of T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 7 (2):188-195, 1995.

W. J. **Freed**. The role of nerve-growth factor (NGF) in the central nervous system. *Brain Res.Bull.* 1 (4):393-412, 1976.

U. **Freedden-Jeffry**, P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, and R. Murray. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J.Exp.Med.* 181 (4):1519-1526, 1995.

W. J. **Friedman** and L. A. Greene. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp.Cell Res.* 253 (1):131-142, 1999.

S. J. **Galli**. Complexity and redundancy in the pathogenesis of asthma: reassessing the roles of mast cells and T cells. *J.Exp.Med.* 186 (3):343-347, 1997.

E. **Garaci**, M. C. Caroleo, L. Aloe, S. Aquaro, M. Piacentini, N. Costa, A. Amendola, A. Micera, R. Calio, C. F. Perno, and R. LEVI-MONTALCINI. Nerve growth factor is an autocrine factor essential for the survival of macrophages infected with HIV. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 96 (24):14013-14018, 1999.

E. **Garaci**, S. Aquaro, C. Lapenta, A. Amendola, M. Spada, S. Covaceuszach, C. F. Perno, and F. Belardelli. Anti-nerve growth factor Ab abrogates macrophage-mediated HIV-1 infection and depletion of CD4+ T lymphocytes in hu-SCID mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (15):8927-8932, 2003.

O. **Garcia-Suarez**, J. Hannestad, I. Esteban, R. Sainz, F. J. Naves, and J. A. Vega. Expression of the TrkB neurotrophin receptor by thymic macrophages. *Immunology* 94 (2):235-241, 1998.

O. **Garcia-Suarez**, A. Germana, J. Hannestad, M. Perez-Perez, I. Esteban, F. J. Naves, and J. A. Vega. Changes in the expression of the nerve growth factor receptors TrkA and p75LNGR in the rat thymus with ageing and increased nerve growth factor plasma levels. *Cell Tissue Res.* 301 (2):225-234, 2000.

O. **Garcia-Suarez**, A. Germana, J. Hannestad, E. Ciriaco, R. Laura, J. Naves, I. Esteban, I. Silos-Santiago, and J. A. Vega. TrkA is necessary for the normal development of the murine thymus. *J.Neuroimmunol.* 108 (1-2):11-21, 2000.

O. **Garcia-Suarez**, A. Germana, J. Hannestad, E. Ciriaco, I. Silos-Santiago, G. Germana, and J. A. Vega. Involvement of the NGF receptors (Trka and p75Ingfr) in the development and maintenance of the thymus. *Ital.J.Anat.Embryol.* 106 (2 Suppl 1):279-285, 2001.

O. **Garcia-Suarez**, M. A. Blanco-Gelaz, M. L. Lopez, A. Germana, R. Cabo, B. Diaz-Esnal, I. Silos-Santiago, E. Ciriaco, and J. A. Vega. Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J.Neuroimmunol.* 129 (1-2):25-34, 2002.

J. J. **Gentry**, P. Casaccia-Bonnel, and B. D. Carter. Nerve growth factor activation of nuclear factor kappaB through its p75 receptor is an anti-apoptotic signal in RN22 schwannoma cells. *J.Biol.Chem.* 275 (11):7558-7565, 2000.

J. J. **Gentry**, P. A. Barker, and B. D. Carter. The p75 neurotrophin receptor: multiple interactors and numerous functions. *Prog.Brain Res.* 146:25-39, 2004.

S. M. **Gold**, K. H. Schulz, S. Hartmann, M. Mladek, U. E. Lang, R. Hellweg, R. Reer, K. M. Braumann, and C. Heesen. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J.Neuroimmunol.* 138 (1-2):99-105, 2003.

R. **Gotz**, R. Koster, C. Winkler, F. Raulf, F. Lottspeich, M. Scharf, and H. Thoenen. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 372 (6503):266-269, 1994.

G. **Grynkiewicz**, M. Poenie, and R. Y. Tsien. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol.Chem.* 260 (6):3440-3450, 1985.

A. **Haapasalo**, T. Saarelainen, M. Moshnyakov, U. Arumae, T. R. Kiema, M. Saarma, G. Wong, and E. Castren. Expression of the naturally occurring truncated trkB neurotrophin receptor induces outgrowth of filopodia and processes in neuroblastoma cells. *Oncogene* 18 (6):1285-1296, 1999.

C. **Hahn**, A. P. Islamian, H. Renz, and W. A. Nockher. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117 (4):787-794, 2006.

A. **Hamada**, N. Watanabe, H. Ohtomo, and H. Matsuda. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Br.J.Haematol.* 93 (2):299-302, 1996.

H. **Hammarberg**, O. Lidman, C. Lundberg, S. Y. Eltayeb, A. W. Gielen, S. Muhallab, A. Svenningsson, H. Linda, P. H. Der Meide, S. Cullheim, T. Olsson, and F. Piehl. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J.Neurosci.* 20 (14):5283-5291, 2000.

J. **Hannestad**, O. Garcia-Suarez, J. J. Huerta, I. Esteban, F. J. Naves, and J. A. Vega. TrkA neurotrophin receptor protein in the rat and human thymus. *Anat.Rec.* 249 (3):373-379, 1997.

P. A. **Hantzopoulos**, C. Suri, D. J. Glass, M. P. Goldfarb, and G. D. Yancopoulos. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 13 (1):187-201, 1994.

S. J. **Hapner**, K. L. Boeshore, T. H. Large, and F. Lefcort. Neural differentiation promoted by truncated trkC receptors in collaboration with p75(NTR). *Dev.Biol.* 201 (1):90-100, 1998.

R. R. **Hardy** and K. Hayakawa. B-lineage differentiation stages resolved by multiparameter flow cytometry. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 764:19-24, 1995.

S. B. **Hartley**, M. P. Cooke, D. A. Fulcher, A. W. Harris, S. Cory, A. Basten, and C. C. Goodnow. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72 (3):325-335, 1993.

M. **Hartmann**, T. Brigadski, K. S. Erdmann, B. Holtmann, M. Sendtner, F. Narz, and V. Lessmann. Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J.Cell Sci.* 117 (Pt 24):5803-5814, 2004.

A. **Hohn**, J. Leibrock, K. Bailey, and Y. A. Barde. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344 (6264):339-341, 1990.

D. M. **Holtzman**, R. A. Sheldon, W. Jaffe, Y. Cheng, and D. M. Ferriero. Nerve growth factor protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury. *Ann.Neurol.* 39 (1):114-122, 1996.

K. **Horigome**, E. D. Bullock, and E. M. Johnson, Jr. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction. *J.Biol.Chem.* 269 (4):2695-2702, 1994.

M. C. **Horne**, P. E. Roth, and A. L. DeFranco. Assembly of the truncated immunoglobulin heavy chain D mu into antigen receptor-like complexes in pre-B cells but not in B cells. *Immunity*. 4 (2):145-158, 1996.

E. J. **Huang** and L. F. Reichardt. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu.Rev.Neurosci.* 24:677-736, 2001.

E. J. **Huang** and L. F. Reichardt. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.* 72:609-642, 2003.

N. Y. **Ip**, C. F. Ibanez, S. H. Nye, J. McClain, P. F. Jones, D. R. Gies, L. Belluscio, M. M. Le Beau, R. Espinosa, III, S. P. Squinto, and . Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (7):3060-3064, 1992.

N. Y. **Ip** and G. D. Yancopoulos. Neurotrophic factor receptors: just like other growth factor and cytokine receptors? *Curr.Opin.Neurobiol.* 4 (3):400-405, 1994.

P. J. **Isackson**, M. D. Towner, and M. M. Huntsman. Comparison of mammalian, chicken and *Xenopus* brain-derived neurotrophic factor coding sequences. *FEBS Lett.* 285 (2):260-264, 1991.

D. E. **James** and F. P. Nijkamp. Neuro-immune interactions in the lung. *Clin.Exp.Allergy* 29 (10):1309-1319, 1999.

C.A. **Janeway** und P. Travers. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*

H. **Jiang**, K. Takeda, P. Lazarovici, Y. Katagiri, Z. X. Yu, G. Dickens, A. Chabuk, X. W. Liu, V. Ferrans, and G. Guroff. Nerve growth factor (NGF)-induced calcium influx and intracellular calcium mobilization in 3T3 cells expressing NGF receptors. *J.Biol.Chem.* 274 (37):26209-26216, 1999.

S. **Jing**, P. Tapley, and M. Barbacid. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9 (6):1067-1079, 1992.

N. **Kanbe**, M. Kurosawa, Y. Miyachi, M. Kanbe, H. Saitoh, and H. Matsuda. Nerve growth factor prevents apoptosis of cord blood-derived human cultured mast cells synergistically with stem cell factor. *Clin.Exp.Allergy* 30 (8):1113-1120, 2000.

Y. **Kannan**, H. Ushio, H. Koyama, M. Okada, M. Oikawa, T. Yoshihara, M. Kaneko, and H. Matsuda. 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood* 77 (6):1320-1325, 1991.

Y. **Kannan**, K. Usami, M. Okada, S. Shimizu, and H. Matsuda. Nerve growth factor suppresses apoptosis of murine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186 (2):1050-1056, 1992.

D. R. **Kaplan**, B. L. Hempstead, D. Martin-Zanca, M. V. Chao, and L. F. Parada. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252 (5005):554-558, 1991.

D. R. **Kaplan**, D. Martin-Zanca, and L. F. Parada. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350 (6314):158-160, 1991.

D. R. **Kaplan** and F. D. Miller. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 (3):381-391, 2000.

R. **Katoh-Semba**, Y. Kaisho, A. Shintani, M. Nagahama, and K. Kato. Tissue distribution and immunocytochemical localization of neurotrophin-3 in the brain and peripheral tissues of rats. *J. Neurochem.* 66 (1):330-337, 1996.

K. **Kawamoto**, T. Okada, Y. Kannan, H. Ushio, M. Matsumoto, and H. Matsuda. Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor. *Blood* 86 (12):4638-4644, 1995.

G. **Keller**, C. Paige, E. Gilboa, and E. F. Wagner. Expression of a foreign gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent haematopoietic precursors. *Nature* 318 (6042):149-154, 1985.

M. **Kerschensteiner**, E. Gallmeier, L. Behrens, V. V. Leal, T. Misgeld, W. E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R. L. Oropeza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189 (5):865-870, 1999.

- G. **Khursigara**, J. Bertin, H. Yano, H. Moffett, P. S. DiStefano, and M. V. Chao. A prosurvival function for the p75 receptor death domain mediated via the caspase recruitment domain receptor-interacting protein 2. *J.Neurosci.* 21 (16):5854-5863, 2001.
- H. **Kimata**, A. Yoshida, C. Ishioka, and H. Mikawa. Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor. *Immunology* 72 (3):451-452, 1991.
- H. **Kimata**, A. Yoshida, C. Ishioka, T. Kusunoki, S. Hosoi, and H. Mikawa. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur.J.Immunol.* 21 (1):137-141, 1991.
- G. **Klein**. Role of EBV and Ig/myc translocation in Burkitt lymphoma. *Antibiot.Chemother.* 46:110-116, 1994.
- R. **Klein**, V. Nanduri, S. A. Jing, F. Lamballe, P. Tapley, S. Bryant, C. Cordon-Cardo, K. R. Jones, L. F. Reichardt, and M. Barbacid. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66 (2):395-403, 1991.
- R. **Klein**, F. Lamballe, S. Bryant, and M. Barbacid. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 8 (5):947-956, 1992.
- H. **Kobayashi** and A. P. Mizisin. Nerve growth factor and neurotrophin-3 promote chemotaxis of mouse macrophages in vitro. *Neurosci.Lett.* 305 (3):157-160, 2001.
- M. **Krajewska**, S. Krajewski, J. M. Zapata, T. Van Arsdale, R. D. Gascoyne, K. Berern, D. McFadden, A. Shabaik, J. Hugh, A. Reynolds, C. V. Clevenger, and J. C. Reed. TRAF-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am.J.Pathol.* 152 (6):1549-1561, 1998.
- A. **Ia Sala**, S. Corinti, M. Federici, H. U. Saragovi, and G. Girolomoni. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J.Leukoc.Biol.* 68 (1):104-110, 2000.

- E. **Labouyrie**, M. Parrens, A. de Mascarel, B. Bloch, and J. P. Merlio. Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J.Neuroimmunol.* 77 (2):161-173, 1997.
- E. **Labouyrie**, P. Dubus, A. Groppi, F. X. Mahon, J. Ferrer, M. Parrens, J. Reiffers, A. de Mascarel, and J. P. Merlio. Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am.J.Pathol.* 154 (2):405-415, 1999.
- F. **Lamballe**, R. Klein, and M. Barbacid. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66 (5):967-979, 1991.
- F. **Lamballe**, P. Tapley, and M. Barbacid. trkC encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* 12 (8):3083-3094, 1993.
- A. **Lambiase**, L. Bracci-Laudiero, S. Bonini, S. Bonini, G. Starace, M. M. D'Elios, M. De Carli, and L. Aloe. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J.Allergy Clin.Immunol.* 100 (3):408-414, 1997.
- M. A. **Laurenzi**, G. Barbany, T. Timmusk, J. A. Lindgren, and H. Persson. Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in rat thymus, spleen tissue and immunocompetent cells. Regulation of neurotrophin-4 mRNA expression by mitogens and leukotriene B4. *Eur.J.Biochem.* 223 (3):733-741, 1994.
- M. A. **Laurenzi**, T. Beccari, L. Stenke, M. Sjolinder, S. Stinchi, and J. A. Lindgren. Expression of mRNA encoding neurotrophins and neurotrophin receptors in human granulocytes and bone marrow cells--enhanced neurotrophin-4 expression induced by LTB4. *J.Leukoc.Biol.* 64 (2):228-234, 1998.
- R. **Lee**, P. Kermani, K. K. Teng, and B. L. Hempstead. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294 (5548):1945-1948, 2001.
- A. **Leon**, A. Buriani, R. Dal Toso, M. Fabris, S. Romanello, L. Aloe, and R. LEVI-MONTALCINI. Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91 (9):3739-3743, 1994.

- E. **Liepinsh**, L. L. Ilag, G. Otting, and C. F. Ibanez. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J.* 16 (16):4999-5005, 1997.
- D. **Lindholm**. Models to study the role of neurotrophic factors in neurodegeneration. *J. Neural Transm. Suppl* 49:33-42, 1997.
- C. **Lomen-Hoerth** and E. M. Shooter. Widespread neurotrophin receptor expression in the immune system and other nonneuronal rat tissues. *J. Neurochem.* 64 (4):1780-1789, 1995.
- K. S. **Madden**, S. Y. Felten, D. L. Felten, P. R. Sundaresan, and S. Livnat. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity in vivo and vitro following chemical sympathectomy. *Brain Behav. Immun.* 3 (1):72-89, 1989.
- K. S. **Madden**, S. Y. Stevens, D. L. Felten, and D. L. Bellinger. Alterations in T lymphocyte activity following chemical sympathectomy in young and old Fischer 344 rats. *J. Neuroimmunol.* 103 (2):131-145, 2000.
- E. **Maggi**. The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology.* 3 (4):233-244, 1998.
- P. C. **Maisonpierre**, L. Belluscio, S. Squinto, N. Y. Ip, M. E. Furth, R. M. Lindsay, and G. D. Yancopoulos. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 247 (4949 Pt 1):1446-1451, 1990.
- M. **Maroder**, D. Bellavia, D. Meco, M. Napolitano, A. Stigliano, E. Alesse, A. Vacca, G. Giannini, L. Frati, A. Gulino, and I. Screpanti. Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J. Immunol.* 157 (7):2864-2872, 1996.
- M. **Maroder**, D. Bellavia, A. Vacca, M. P. Felli, and I. Screpanti. The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917:741-747, 2000.
- H. **Matsuda**, M. D. Coughlin, J. Bienenstock, and J. A. Denburg. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85 (17):6508-6512, 1988.

- H. **Matsuda**, Y. Kannan, H. Ushio, Y. Kiso, T. Kanemoto, H. Suzuki, and Y. Kitamura. Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J.Exp.Med.* 174 (1):7-14, 1991.
- S. E. **McKay**, A. L. Purcell, and T. J. Carew. Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning. *Learn.Mem.* 6 (3):193-215, 1999.
- E. **Mertsching**, U. Grawunder, V. Meyer, T. Rolink, and R. Ceredig. Phenotypic and functional analysis of B lymphopoiesis in interleukin-7-transgenic mice: expansion of pro/pre-B cell number and persistence of B lymphocyte development in lymph nodes and spleen. *Eur.J.Immunol.* 26 (1):28-33, 1996.
- M. **Metsis**. Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol.Life Sci.* 58 (8):1014-1020, 2001.
- F. **Mignini**, V. Streccioni, and F. Amenta. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton.Autacoid.Pharmacol.* 23 (1):1-25, 2003.
- L. **Minichiello**, F. Piehl, E. Vazquez, T. Schimmang, T. Hokfelt, J. Represa, and R. Klein. Differential effects of combined trk receptor mutations on dorsal root ganglion and inner ear sensory neurons. *Development* 121 (12):4067-4075, 1995.
- L. **Minichiello** and R. Klein. TrkB and TrkC neurotrophin receptors cooperate in promoting survival of hippocampal and cerebellar granule neurons. *Genes Dev.* 10 (22):2849-2858, 1996.
- K. **Miura**, S. S. Saini, G. Gauvreau, and D. W. MacGlashan, Jr. Differences in functional consequences and signal transduction induced by IL-3, IL-5, and nerve growth factor in human basophils. *J.Immunol.* 167 (4):2282-2291, 2001.
- G. **Moalem**, A. Gdalyahu, Y. Shani, U. Otten, P. Lazarovici, I. R. Cohen, and M. Schwartz. Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *J.Autoimmun.* 15 (3):331-345, 2000.
- J. J. **Mond**, Q. Vos, A. Lees, and C. M. Snapper. T cell independent antigens. *Curr.Opin.Immunol.* 7 (3):349-354, 1995.

T. **Nagasawa**. A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int.J.Hematol.* 72 (4):408-411, 2000.

T. **Nagatsu**, M. Mogi, H. Ichinose, and A. Togari. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J.Neural Transm.Suppl* (60):277-290, 2000.

A. **Nakagawara**. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 169 (2):107-114, 2001.

A. E. **Namen**, S. Lupton, K. Hjerrild, J. Wignall, D. Y. Mochizuki, A. Schmierer, B. Mosley, C. J. March, D. Urdal, and S. Gillis. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature* 333 (6173):571-573, 1988.

C. **Nassenstein**, O. Schulte-Herbruggen, H. Renz, and A. Braun. Nerve growth factor: the central hub in the development of allergic asthma? *Eur.J.Pharmacol.* 533 (1-3):195-206, 2006.

G. L. **Nicolson** and D. G. Menter. Trophic factors and central nervous system metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14 (4):303-321, 1995.

A. S. **Nilsson**, M. Fainzilber, P. Falck, and C. F. Ibanez. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett.* 424 (3):285-290, 1998.

W. A. **Nockher** and H. Renz. Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117 (3):583-589, 2006.

W. A. **Nockher** and H. Renz. Neurotrophins and asthma: novel insight into neuroimmune interaction. *J.Allergy Clin.Immunol.* 117 (1):67-71, 2006.

G. J. **Nossal**. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76 (2):229-239, 1994.

A. **Obermeier**, R. A. Bradshaw, K. Seedorf, A. Choidas, J. Schlessinger, and A. Ullrich. Neuronal differentiation signals are controlled by nerve growth factor receptor/Trk binding sites for SHC and PLC gamma. *EMBO J.* 13 (7):1585-1590, 1994.

- U. **Otten**, P. Ehrhard, and R. Peck. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86 (24):10059-10063, 1989.
- J. J. **Owen**, D. E. McLoughlin, R. K. Suniara, and E. J. Jenkinson. Cellular and matrix interactions during the development of T lymphocytes. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 32 (5):551-555, 1999.
- M. **Parrens**, E. Labouyrie, A. Groppi, P. Dubus, D. Carles, J. F. Velly, A. de Mascarel, and J. P. Merlio. Expression of NGF receptors in normal and pathological human thymus. *J.Neuroimmunol.* 85 (1):11-21, 1998.
- A. **Patapoutian** and L. F. Reichardt. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11 (3):272-280, 2001.
- M. **Perez-Perez**, O. Garcia-Suarez, I. Esteban, A. Germana, I. Farinas, F. J. Naves, and J. A. Vega. p75NTR in the spleen: age-dependent changes, effect of NGF and 4-methylcatechol treatment, and structural changes in p75NTR-deficient mice. *Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.* 270 (2):117-128, 2003.
- L. G. **Pinon**, L. Minichiello, R. Klein, and A. M. Davies. Timing of neuronal death in trkA, trkB and trkC mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signalling. *Development* 122 (10):3255-3261, 1996.
- S. L. **Pomeroy**, M. E. Sutton, L. C. Goumnerova, and R. A. Segal. Neurotrophins in cerebellar granule cell development and medulloblastoma. *J.Neurooncol.* 35 (3):347-352, 1997.
- S. **Rabizadeh**, J. Oh, L. T. Zhong, J. Yang, C. M. Bitler, L. L. Butcher, and D. E. Bredesen. Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 261 (5119):345-348, 1993.
- S. P. **Raychaudhuri** and S. K. Raychaudhuri. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog.Brain Res.* 146:433-437, 2004.
- H. **Renz**. The role of neurotrophins in bronchial asthma. *Eur.J.Pharmacol.* 429 (1-3):231-237, 2001.

- A. **Richard**, S. R. McColl, and G. Pelletier. Interleukin-4 and nerve growth factor can act as cofactors for interleukin-3-induced histamine production in human umbilical cord blood cells in serum-free culture. *Br.J.Haematol.* 81 (1):6-11, 1992.
- A. **Rolink** and F. Melchers. B lymphopoiesis in the mouse. *Adv.Immunol.* 53:123-156, 1993.
- A. **Rolink** and F. Melchers. B-cell development in the mouse. *Immunol.Lett.* 54 (2-3):157-161, 1996.
- S. **Romagnani**. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J.Clin.Immunol.* 15 (3):121-129, 1995.
- C. R. **Rose**, R. Blum, B. Pichler, A. Lepier, K. W. Kafitz, and A. Konnerth. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426 (6962):74-78, 2003.
- P. P. **Roux**, A. L. Bhakar, T. E. Kennedy, and P. A. Barker. The p75 neurotrophin receptor activates Akt (protein kinase B) through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J.Biol.Chem.* 276 (25):23097-23104, 2001.
- P. P. **Roux** and P. A. Barker. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog.Neurobiol.* 67 (3):203-233, 2002.
- M. **Ryden**, B. Hempstead, and C. F. Ibanez. Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor. *J.Biol.Chem.* 272 (26):16322-16328, 1997.
- P. **Sacerdote**, B. Manfredi, L. Aloe, A. Micera, and A. E. Panerai. Centrally injected nerve growth factor modulates peripheral immune responses in the rat. *Neuroendocrinology* 64 (4):274-279, 1996.
- A. **Salehi**, J. D. Delcroix, and D. F. Swaab. Alzheimer's disease and NGF signaling. *J.Neural Transm.* 111 (3):323-345, 2004.
- A. H. **Salehi**, S. Xanthoudakis, and P. A. Barker. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J.Biol.Chem.* 277 (50):48043-48050, 2002.

- L. **Santambrogio**, M. Benedetti, M. V. Chao, R. Muzaffar, K. Kulig, N. Gabellini, and G. Hochwald. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J.Immunol.* 153 (10):4488-4495, 1994.
- J. **Sawada**, A. Itakura, A. Tanaka, T. Furusaka, and H. Matsuda. Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Blood* 95 (6):2052-2058, 2000.
- A. **Schenone**, J. S. Gill, D. A. Zacharias, and A. J. Windebank. Expression of high- and low-affinity neurotrophin receptors on human transformed B lymphocytes. *J.Neuroimmunol.* 64 (2):141-149, 1996.
- A. **Schober**, K. Huber, J. Fey, and K. Unsicker. Distinct populations of macrophages in the adult rat adrenal gland: a subpopulation with neurotrophin-4-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 291 (3):365-373, 1998.
- I. **Screpanti**, D. Meco, S. Scarpa, S. Morrone, L. Frati, A. Gulino, and A. Modesti. Neuromodulatory loop mediated by nerve growth factor and interleukin 6 in thymic stromal cell cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (8):3209-3212, 1992.
- R. A. **Segal** and M. E. Greenberg. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu.Rev.Neurosci.* 19:463-489, 1996.
- R. A. **Segal**. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. *Annu.Rev.Neurosci.* 26:299-330, 2003.
- M. **Sekimoto**, T. Tsuji, J. Matsuzaki, K. Chamoto, T. Koda, K. Nemoto, M. Degawa, S. Nishimura, and T. Nishimura. Functional expression of the TrkC gene, encoding a high affinity receptor for NT-3, in antigen-specific T helper type 2 (Th2) cells. *Immunol.Lett.* 88 (3):221-226, 2003.
- M. **SELA**, F. H. WHITE, Jr., and C. B. ANFINSEN. Reductive cleavage of disulfide bridges in ribonuclease. *Science* 125 (3250):691-692, 1957.
- E. **Shibayama** and H. Koizumi. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am.J.Pathol.* 148 (6):1807-1818, 1996.

I. **Silos-Santiago**, A. M. Fagan, M. Garber, B. Fritzsche, and M. Barbacid. Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking TrkB and TrkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur.J.Neurosci.* 9 (10):2045-2056, 1997.

A. Z. **Sin**, E. M. Roche, A. Togias, L. M. Lichtenstein, and J. T. Schroeder. Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J.Allergy Clin.Immunol.* 108 (3):387-393, 2001.

Y. **Susaki**, S. Shimizu, K. Katakura, N. Watanabe, K. Kawamoto, M. Matsumoto, M. Tsudzuki, T. Furusaka, Y. Kitamura, and H. Matsuda. Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor. *Blood* 88 (12):4630-4637, 1996.

R. **Tabakman**, S. Lecht, S. Sephanova, H. Arien-Zakay, and P. Lazarovici. Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Prog.Brain Res.* 146:387-401, 2004.

S. Y. **Tam**, M. Tsai, M. Yamaguchi, K. Yano, J. H. Butterfield, and S. J. Galli. Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 90 (5):1807-1820, 1997.

L. W. **Thorpe** and J. R. Perez-Polo. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J.Neurosci.Res.* 18 (1):134-139, 1987.

T. **Timmusk**, N. Belluardo, M. Metsis, and H. Persson. Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur.J.Neurosci.* 5 (6):605-613, 1993.

M. **Torcia**, L. Bracci-Laudiero, M. Lucibello, L. Nencioni, D. Labardi, A. Rubartelli, F. Cozzolino, L. Aloe, and E. Garaci. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85 (3):345-356, 1996.

M. **Toyoda**, M. Nakamura, T. Makino, T. Hino, M. Kagoura, and M. Morohashi. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br.J.Dermatol.* 147 (1):71-79, 2002.

- T. **Tsuda**, D. Wong, J. Dolovich, J. Bienenstock, J. Marshall, and J. A. Denburg. Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood* 77 (5):971-979, 1991.
- A. **Ullrich**, A. Gray, C. Berman, and T. J. Dull. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 303 (5920):821-825, 1983.
- M. H. **Ullsch**, C. Wiesmann, L. C. Simmons, J. Henrich, M. Yang, D. Reilly, S. H. Bass, and A. M. de Vos. Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J.Mol.Biol.* 290 (1):149-159, 1999.
- W. **Van Ewijk**. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu.Rev.Immunol.* 9:591-615, 1991.
- C. **Wetmore** and L. Olson. Neuronal and nonneuronal expression of neurotrophins and their receptors in sensory and sympathetic ganglia suggest new intercellular trophic interactions. *J.Comp Neurol.* 353 (1):143-159, 1995.
- C. **Wiesmann** and A. M. de Vos. Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol.Life Sci.* 58 (5-6):748-759, 2001.
- T. A. **Yacoubian** and D. C. Lo. Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat.Neurosci.* 3 (4):342-349, 2000.
- M. **Yamamoto**, G. Sobue, K. Yamamoto, S. Terao, and T. Mitsuma. Expression of mRNAs for neurotrophic factors (NGF, BDNF, NT-3, and GDNF) and their receptors (p75NGFR, trkA, trkB, and trkC) in the adult human peripheral nervous system and nonneural tissues. *Neurochem.Res.* 21 (8):929-938, 1996.
- X. **Ye**, P. Mehlen, S. Rabizadeh, T. VanArsdale, H. Zhang, H. Shin, J. J. Wang, E. Leo, J. Zapata, C. A. Hauser, J. C. Reed, and D. E. Bredesen. TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J.Biol.Chem.* 274 (42):30202-30208, 1999.

T. **Yoshioka**, I. Hikita, M. Asakawa, T. Hirasawa, M. Deguchi, T. Matsutani, H. Oku, T. Horikawa, and A. Arimura. Spontaneous scratching behaviour in DS-Nh mice as a possible model for pruritus in atopic dermatitis. *Immunology* 118 (3):293-301, 2006.

N. **Zampieri** and M. V. Chao. Structural biology. The p75 NGF receptor exposed. *Science* 304 (5672):833-834, 2004.

## Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik (Fachbereich Medizin) der Philipps Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Renz angefertigt.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Harald Renz für das in mich gesetzte Vertrauen. Durch die Bereitstellung herausragender Arbeitsbedingungen sowie zahlreicher wissenschaftlicher Diskurse ermöglichte er die Durchführung sämtlicher Experimente, auch wenn dafür „methodisches Neuland“ betreten werden musste.

Bei Herrn Dr. Andreas Nockher, dem Leiter der Neurotrophin-Arbeitsgruppe bedanke ich mich für Betreuung während der Doktorarbeit.

Insbesondere bedanke ich mich auch bei Technischen Assistentinnen Frau Anka Wensing, Frau Spiess-Naumann, Frau Stefanie Achenbach und Frau Wilma Hastedt für ihre nimmermüde Unterstützung bei zahlreichen Laborarbeiten.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. Alexander Dietrich, aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie für seine Unterstützung bei den endlos langen Calcium-Messungen sowie für tiefgründiges Korrekturlesen. Ohne seine ständigen Nachfragen nach dem Stand der Arbeit wäre diese sicher heute noch nicht fertig...

Bei Herrn PD Dr. Martin Klingenspor aus dem Institut für Biologie bedanke ich mich herzlich für seine engagierte Supervision dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir immer den nötigen Rückhalt geboten hat.

## Lebenslauf

**Name:** Berit Sel, geb. Schuhmann

**Anschrift:** Wickegarten 16  
35043 Marburg  
Tel.: 06421-303660

Geburtsdatum: 22.06.1975

Geburtsort: Lübz

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### Bildungsgang:

Juli 1994: Schulabschluß mit dem Abitur  
Durchschnitt: 1.5

Oktober 1994 -

April 1995 Handwerkliches-Praktikum

April 1995 Beginn des Studiengangs Diplombiologie an der  
Freien Universität Berlin

Juli 1997 Vordiplomsprüfung mit der Note: „sehr gut“

WS 97/98 Urlaubssemester

Juni 2000 Ablegung der mündlichen Diplomprüfungen  
Note: „sehr gut“

Juli 2000-

Mai 2001: Diplomarbeit zum Thema:  
„Klonierung, Überexpression und funktionelle Charakterisierung des  
Gallerimycins aus „*Galleria mellonella*“ am Institut für Zoologie der  
Freien Universität Berlin  
Note „ sehr gut“

---

**Beruflicher Werdegang:**

April 1999-

März 2001            Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben (Tutorin)  
am Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin

September 2001-

Dezember 2004    Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für klinische  
Chemie und Molekulare Diagnostik am Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

Beginn der Promotion zum Thema: „Einfluss von  
Neurotrophinen auf Wachstum und Entwicklung von B- und T-  
Lymphozyten“

Seit März 2007:    Wissenschaftliche Angestellte in der Abteilung für klinische  
Chemie und Molekulare Diagnostik am Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

## Publikationen

**Schuhmann B**, Seitz V, Vilcinskas A, Podsiadlowski L: Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. Arch Insect Biochem Physiol. 2003

Teile dieser Doktorarbeit wurden bisher wie folgt publiziert:

**Schuhmann B**, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA: A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. J Neuroimmunol. 2005

### Veröffentlichte Abstracts:

Emmel J, **Schuhmann B**, Renz H, Nockher WA. Expression of neurotrophins and neurotrophin receptors in mouse B cells. Immunobiology. 2002

**Schuhmann B**, Rost S, Sel S, Renz H, Nockher WA: Impaired lymphocyte proliferation in the BDNF-knockout mouse. Immunobiology. 2003

Hahn C., **Schuhmann B**., Mkhlof S., Pirayesh A., Renz H., Nockher WA.: Epithelial NGF and BDNF production induce prolonged survival of eosinophils during allergic airway inflammation. J Allergy Clin Immunol. 2005