

**Die Bedeutung von „Nerve Growth Factor“ (NGF) bei Schmerz- und
Entzündungsgeschehen unter besonderer Berücksichtigung
rheumatischer Erkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**vorgelegt von: Marjeta Herguijuela Albarran, geb. Perkavec
aus: Ljubljana/Slowenien**

Erscheinungsjahr: 2007

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Vetter**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Otten**

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.08.2007

**Aus der Medizinischen Poliklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn**

Direktor: Prof. Dr. med. Hans Vetter

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert**

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
2 Material und Methoden	9
3 Nerve Growth Factor.....	10
3.1 Historisches zu NGF	10
3.2 Struktur von NGF.....	11
3.3 Biosynthese von NGF	13
3.4 Rezeptoren von NGF.....	15
3.5 Pro-NGF.....	18
3.6 NGF-induzierte Genaktivierung über Transkriptionsfaktoren.....	21
3.7 Antagonisten	23
3.8 Meßverfahren für NGF	25
3.9 Die Familie der Neurotrophine	28
3.10 NGF und das Nervensystem.....	31
3.11 NGF und Zellen des Immunsystems	34
3.12 NGF und das neuroendokrine System.....	37
3.13 NGF und Zytokine	38
3.14 NGF und Neuropeptide	41
3.15 Neurogene Entzündung und Schmerzentstehung.....	49
3.15.1 Einführung	49
3.15.2 Synovialer Reiz und Schmerzentstehung.....	50
4 NGF bei entzündlich-rheumatischen und degenerativen Erkrankungen	61
4.1 Rheumatoide Arthritis (RA).....	61
4.2 Juvenile chronische Arthritis	65
4.3 Psoriasis	66
4.4 Morbus Reiter	71
4.5 Chondrokalzinose.....	72
4.6 Spondarthritis ankylosans	72
4.7 HLA B27 positive Athritiden.....	72
4.8 Infektiöse Arthritis des Kniegelenkes	73

4.9	Systemische Sklerodermie	73
4.10	Systemischer Lupus erythematoses (SLE)	76
4.11	Vaskulitiden	77
4.11.1	Kawasaki-Syndrom	77
4.11.2	Churg-Strauss-Syndrom und Panarteriitis nodosa	80
4.11.3	Arteriitis temporalis superficialis	81
4.12	Morbus Behçet	82
4.13	Fibromyalgiesyndrom	83
4.14	Spinale Nervenkompressionssyndrome	84
4.15	Arthrose	87
4.16	Natürliche anti-NGF Autoantikörper bei autoimmunen Erkrankungen	91
5	Diskussion	96
6	Zusammenfassung	106
7	Literaturverzeichnis	107

Abkürzungsverzeichnis

ACTH: Adrenocorticotropes Hormon

AP-1: Aktivator Protein, Transkriptionsfaktor

BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat

CCK: Cholecystokinin, Neuropeptid

cDNA: copy-DNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure

c-fos: Proto-Oncogen

CGRP: Calcitonin gene-related Peptid, Neuropeptid

ChAT: Choline Acetyltransferase

c-jun: Proto-Oncogen

CNTF: Ciliary neurotrophic Faktor, Neurotrophin

CSF: cerebrospinale Flüssigkeit

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Messverfahren

EZM: Extra Zelluläre Matrix

FGF: Fibroblast growth Faktor, Neurotrophin

FMS: Fibromyalgiesyndrom

Freund-Adjuvans: Emulsion, die abgetötetes Mycobacterium tuberculosis enthält und bei Applikation Entzündungen hervorruft

GDNF: Glial cell line-derived neurotrophic Faktor, Neurotrophin

Ig: Immunglobuline

IGF: Insulin-like growth Faktor, Neurotrophin

IL-1 β : Interleukin-1 beta, Zytokin

IR: Immunoreaktivität

LIF: Leukaemia Inhibitory Faktor, Zytokin

MMP: Matrixmetalloproteinasen

mRNA: messenger Ribonukleinsäure, spiegelbildliche Kopie der DNA

NF- κ B: Nuclear Factor- κ B, Transkriptionsfaktor

NGF: Nerve Growth Faktor

NKA: Neurokinin A, Tachykinin

NKB: Neurokinin B, Tachykinin

NK_{1,3}: Neurokininrezeptoren 1 bis 3

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat, neuraler Rezeptor

NPY: Neuropeptid Y

NSAR: Nichtsteroidale Antirheumatika

NT-3: Neurotrophin-3

NT-4/5: Neurotrophin-4/5

PC12 Zellen: Phaeochromocytomzellen, geklonte Zellreihe aus einem Medulla-Tumor bei Ratten

PCAP: Pituitary adenylate cyclase activating Polypeptid, Neuropeptid

PNS: peripheres Nervensystem

P75: low-affinity-Rezeptor für Neurotrophine

RA: Rheumatoide Arthritis

RNA: Ribonukleinsäure

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction, Messverfahren

SF: synoviale Flüssigkeit

SLE: Systemischer Lupus erythematoses

SOM: Somatostatin, Neuropeptid

SP: Substanz P, Neuropeptid

TNF- α : Tumor Necrose Factor, Zytokin

Trk: Tyrosinkinase, high-affinity-Rezeptor für Neurotrophine

VIP: Vasointestinales Peptid, Neuropeptid

ZNS: zentrales Nervensystem

48/80: Lösung, die ein potenter Degranulator von Mastzellen ist

5-HT: 5-Hydroxytryptamin, Serotonin

6-OHDA: 6-Hydroxydopamin, zerstört selektiv die peripheren, sympathischen Nervenenden

1 Einleitung

Entzündlich rheumatische, aber auch degenerative Systemerkrankungen sind durch ein komplexes Netzwerk von Mediatoren gekennzeichnet. Die zunehmende Kenntnis dieser Zusammenhänge hat zu bedeutenden Fortschritten nicht nur in der Diagnose, sondern auch in der Therapie vieler rheumatischer Erkrankungen geführt. Die pharmakologische Blockade von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), der zu einem der wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen zählt, ist aus der modernen Rheumatherapie nicht mehr wegzudenken. Andere Antizytokintherapien schließen das Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Interleukin-6 (IL-6) ein. Dennoch sprechen nicht alle Patienten auf diese Therapien an, was die Frage nach gänzlich anderen entzündlichen Mechanismen aufwirft.

Die symmetrische Anordnung des Gelenkbefalls bei vielen entzündlichen Erkrankungen ist ein Hinweis dafür, dass neurogene Mechanismen eine Rolle spielen (Kidd et al., 1989). Nach neuronalen Läsionen, wie eine Hemiplegie nach hirnischämischen Insult (Kidd et al., 1989; Thompson und Bywaters, 1966), oder nach Poliomyelitis (Glick, 1967), sistiert die Synovitis auf der plegischen Seite. Auch Psychischer Stress wurde als ein Faktor für die Exazerbation einer rheumatoiden Arthritis beobachtet (Baker, 1982). Diese klinischen Zusammenhänge zeigen, dass das Nervensystem beim Unterhalt, vielleicht aber auch ursächlich an autoimmunen Gelenkerkrankungen beteiligt ist. Die pathologische Aktivierung afferenter und efferenter Bahnen des peripheren Nervensystems führt zu einer Freisetzung von bioaktiven Substanzen wie den Neuropeptiden Substanz P (SP) und Calcitonin gene-related peptide (CGRP), deren Wirkung auf Mastzellen, Immunzellen und Zellen der glatten Muskulatur der Gefäße eine Entzündung hervorruft. Diese resultierende Entzündung ist durch Erythem, Hyperämie, Ödem und Hypersensibilität/Schmerz gekennzeichnet. Dieses Phänomen, dass Entzündungszeichen von neuronalen Strukturen ausgehen, wurde als neurogene Entzündung bezeichnet.

Ein wichtiger neuronotropher Mediator ist „Nerve Growth Factor“ (NGF). Dieses Molekül reguliert die Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung von sensorischen und sympathischen Neuronen aus dem Neuralkamm. Erhöhte NGF-Konzentrationen wurden bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen und bei experimentellen Tiermodellen gefunden. Auch bei der Schmerzentstehung und Entwicklung von überschießenden Schmerzen im Sinne der Hyperalgesie spielt NGF eine wichtige Rolle. Zusätzlich ist NGF auch in die pathobiochemischen

Prozesse der neurogenen Entzündung involviert: zum einen indirekt über die Fähigkeit, die Neuropeptid-Synthese zu stimulieren (Amann et al., 1996; Edwards et al., 1988b; Lindsay und Harmer 1989) und zum anderen direkt über seine modulierende Wirkung auf Zellen des Immunsystems (Aloe et al., 1997).

NGF hat viele Funktionen im peripheren Nervensystem, sowie im endokrinen- und Immunsystem. Es wäre deshalb denkbar, dass die pharmakologische Antagonisierung von NGF eine neue therapeutische Strategie bei autoimmunen Erkrankungen darstellt.

Diese Arbeit untersucht als Metaanalyse die NGF-Beteiligung an entzündlichen und nicht entzündlichen Prozessen, sowie an der Schmerzentstehung bei rheumatischen Erkrankungen. Die Funktion von NGF, seine Interaktion mit dem Immunsystem, den Mediatoren der neurogenen Entzündung und Zytokinen sollen erörtert und potenzielle Therapieansätze diskutiert werden.

2 Material und Methoden

Für diese Metaanalyse wurden elektronische Datenbanken wie Medline und Medpilot sowie die deutsche Zentralbibliothek für Medizin in Köln und die Bibliotheken in Basel und Bern herangezogen. Zur Recherche wurden folgende Suchbegriffe angewendet: NGF, arthritis, neurogenic inflammation, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, collagen arthritis, arteriitis, psoriasis, Sjogren syndrome, systemic lupus erythematosus, gout, osteoporosis, lower back pain, lumbar disc herniation, nerve root compression, spondarthritis, algoneurodystrophy, fibromyalgia, pain, therapy, antagonist, Kawasaki syndrome, cytokine etc.. Überprüft wurden ca. 800 Zusammenfassungen in englischer und deutscher Sprache, wovon 320 als Volltext durchgearbeitet wurden.

Bezüglich der entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wurden alle Artikel, die bis einschließlich 2005 erschienen sind, berücksichtigt. Die Vorgeschichte und allgemeinen Erkenntnisse von NGF betreffend wurden die wichtigsten Zusammenhänge bis 2005 zusammengestellt.

3 Nerve Growth Factor

3.1 *Historisches zu NGF*

Die Geschichte von NGF begann 1948, als Elmer Bueker, ein Student von Viktor Hamburger, nach Implantation eines kleinen Fragmentes eines malignen Maus-Tumors (Sarkoma 180 und 37) in Hühnerembryonen beobachtete, dass eine erhebliche Invasion von sensorischen Nervenfasern den Tumor und die peripheren Ganglien auf der implantierten Seite deutlich größer waren, als auf der Gegenseite (Bueker, 1948). 1951 wurden die Experimente von Viktor Hamburger und Rita Levi-Montalcini fortgesetzt und sie stellten fest, dass das implantierte Gewebe im Hühnerembryo eine um das 6-fache gesteigerte Größe der paravertebralen Ganglien, deutlich weniger der Spinalganglien, bewirkte. Die zuvor von Ramón y Cajal durchgeführten umfangreichen Untersuchungen des Nervensystems bei Hühnerembryonen mit der von ihm entwickelten Silber-spezifischen Färbetechnik war bei den Untersuchungen von Rita Levi-Montalcini weiterverwendet und optimiert worden. Nach weiteren Versuchen demonstrierte Rita Levi-Montalcini die Anwesenheit eines löslichen Wachstumsfaktors, das in dem Sarkomgewebe sezerniert und über Diffusion die sensorischen und sympathischen Nervenzellen des Embryos zu erheblichem Wachstum anregte (Levi-Montalcini und Hamburger, 1951; Levi-Montalcini, 1952). 1952 gab sie diesem Faktor den Namen NGF. 1986 erhielt Rita Levi-Montalcini mit Stanley Cohen zusammen den Nobelpreis für Physiologie/Medizin.

Die Isolierung von NGF gelang beiden zunächst aus Kulturen sympathischer Ganglien (Cohen et al., 1954; Cohen und Levi-Montalcini, 1956; Cohen, 1959; Cohen, 1960). Zusammen entdeckten sie andere Quellen für NGF: vor allem aus der Giftdrüse von Schlangengift und den submaxillären Speicheldrüsen der männlichen Maus. Aus der zunehmenden Gewinnung von NGF aus exokrinen Drüsen wie die Giftdrüse der Schlange (Angeletti, 1968; Bailey et al., 1975; Cohen ,1959; Hogue-Angeletti et al., 1976), Prostata des Meerschweinchens (Chapman et al., 1981; Rubin und Bradshaw, 1981), Samen und Samenblasen von Bullen (Harper et al., 1982; Hofman und Unsicker, 1982) und submaxillären Speicheldrüse der südafrikanische Ratte (*Mastomia natalensis*) (Aloe et al., 1981; Darling und Fahnestock, 1988) führte zu der Möglichkeit, die Effekte von NGF weiter zu charakterisieren und über die Herstellung von NGF-Antikörpern weitere Erkenntnisse zu gewinnen. Die Isolierung von cDNA Klonen für Maus-NGF (Scott et al., 1983; Ullrich et al., 1983) führte zum Klonen von NGF-Genen des Menschen, von

Rindern, Affen, Ratten und des Meerschweinchens (Ebendal et al., 1986; Fahnestock und Bell, 1988; Meier et al., 1986; Schwarz et al., 1989; Ullrich et al., 1984; Whittmore et al., 1988; Wion et al., 1986), wobei sich zeigte, dass eine erstaunliche Homologie von NGF-Sequenzen zwischen den verschiedenen Spezies besteht. Allerdings steht diese Homogenität im Widerspruch zu der geringen immunologischen Kreuzreaktivität zwischen den NGF`s der verschiedenen Arten.

3.2 Struktur von NGF

Die ersten Erkenntnisse über die Struktur, Synthese und biologische Aktivität von NGF sind viele Jahre lang durch die Gewinnung von NGF aus den Speicheldrüsen der männlichen Maus gesammelt worden. Dieses NGF hat einen Sedimentationskoeffizienten von 7S, von dem ein Molekulargewicht von 140000 kalkuliert wurde (Varon et al., 1968). Der Komplex setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen (Server und Shooter, 1977): α , β und γ . Die meist untersuchte Untereinheit ist das β -NGF, welches durch zwei Forschungsgruppen Ullrich et al. (1983), sowie Scott et al. (1983) isoliert wurde.

β -NGF ist in dem 7S-Komplex als nicht-konvalent gebundenes Dimer mit einem Molekulargewicht von 26000 enthalten und ist ein 12.5-kDa Protein, das alle erhaltenden und wachstumsfördernden Aktivitäten des NGF besitzt. Es lässt sich in zwei identische Ketten von 118 Aminosäuren spalten (Varon und Shooter). Sowohl die Monomere, als auch das Dimer sind biologisch aktiv (Frazier et al., 1973a; Stach und Shooter, 1974). Jede Kette enthält drei Disulfid-Verbindungen (S-S), deren Reduktion den vollständigen Verlust der biologischen Aktivität verursacht (Greene und Shooter, 1980; Thoenen und Barde, 1980). Während die Tyrosin-Anteile nicht für die Aktivität benötigt werden, sind die Tryptophan-Anteile wichtig für die biologische Funktion, denn ihre Oxidierung verursacht den Verlust der Aktivität und der Bindung an den Rezeptor (Cohen et al., 1980; Frazier et al., 1973b). Es existiert eine glykolysierte Form in geringen Mengen in der Speicheldrüse der Maus, die sich in ihrer Aktivität nicht von der nicht-glykolysierten Form unterscheidet (Murphy et al., 1989).

Die zwei **γ -Untereinheiten** des 7S NGF Komplexes sind für die proteolytische Wirkung verantwortlich (Greene et al., 1969). Diese Untereinheit gehört zu der Kallikrein-Familie von Trypsin-ähnlichen Proteasen (Evans und Richards, 1985; Thomas et al., 1981a; Ullrich et al.,

1984). Die γ -Untereinheit hat wie andere Kallikreine ein Molekulargewicht von 26000 und ist glykolysiert. Sie hat in hohem Maße elektrophoretische Heterogenität: bis zu 6 verschiedene Formen sind nachgewiesen worden (Stach et al., 1976; Thomas et al., 1981b). Diese Formen bestehen aus zwei bis drei Ketten, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind. Die Esterase-Aktivität aller Formen ist äquivalent (Server und Shooter, 1977). Diese Heterogenität hat nichts mit verschiedenen Produktionsquellen in verschiedenen Geweben zu tun, denn alle 6 Formen sind gleichzeitig in der submandibulären Drüse der Maus nachgewiesen worden (Stach et al., 1976; Thomas et al., 1981b). Der 7S-Komplex des NGF ist mit der γ^3 -Form (eine Form mit drei Ketten) die stabilste (Nichols und Shooter, 1983; Thomas et al., 1981b). Die γ -Untereinheit ist an der Entwicklung des β -NGF-Vorläufers beteiligt. Das C-Ende dieses Vorläufers besteht aus den Aminosäure-Sequenzen Arg-Arg-Gly. Die γ -Einheit spaltet zwischen den Arg-Arg-Residuen des β -NGF-Vorläufers die Verbindung, setzt somit ein Dipeptid mit C-Ende frei und bleibt am C-Ende Arg von β -NGF gebunden (Berger und Shooter, 1977; Bothwell und Shooter, 1978). Bei Entfernung des Arg am C-Ende des β -NGF wird die Bindung der γ -Untereinheit an das β -NGF und somit die Bildung des 7S-Komplexes verhindert (Bothwell und Shooter, 1978; Greene et al., 1968; Moore et al., 1974).

Die Nukleotid-Sequenz der **α -Untereinheit** hat eine große Ähnlichkeit mit der γ -Untereinheit und gehört somit auch zu den Kallikreinen (Evans und Richards, 1985; Isackson und Brandshaw, 1984). Wie die γ -Untereinheit ist auch die α -Untereinheit glykolysiert und ist in 4 verschiedenen 2-kettigen Molekülen nachgewiesen worden (Isackson, 1987). In jedem 7S-Komplex sind 2 α -Einheiten vorhanden, sodass die Stöchiometrie des 7S-NGF $\alpha_2\beta\gamma_2$ beträgt (Server und Shooter, 1977). Die α -Untereinheit besitzt keine enzymatische Aktivität. Es wird angenommen, dass sie β -NGF vor der Proteolyse schützt und seine biologische Aktivität reguliert.

Erst das Klonen von Mäuse-, Rinder-, Hühner- und Menschen-NGF, sowie die Analyse der Aminosäure-Sequenzen erlaubten einen Vergleich der Sequenzen verschiedener Spezies. Dabei zeigte sich eine extrem hohe Erhaltung während der Evolution. Von den 118 Aminosäuren des β -NGF bei der Maus sind nur 16 beim Rind und 19 beim Huhn verändert (Meier et al., 1986). Auch beim Menschen sind die Nukleotid-Sequenzen denen der Maus sehr ähnlich (Ullrich et al., 1983). Das menschliche NGF hat als C-Ende Arg-Arg-Ala, das der Maus Arg-Arg-Gly und kann somit von der γ -Untereinheit gespalten werden. Bei sehr ähnlichem Aufbau des NGF bei den

verschiedenen Spezies ist dennoch die immunologische Kreuzreaktivität sehr gering. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass die unterschiedlichen Aminosäuren nicht vereinzelt, sondern in Clustern auftreten. Diese Veränderungen sind nahezu ausschließlich in den hydrophilen Domänen lokalisiert (Meier et al., 1986). Nur eine der hydrophilen Domänen ist bei allen bisher untersuchten Spezies streng identisch (Meier et al., 1986).

3.3 Biosynthese von NGF

Die Struktur, Biosynthese und biologische Aktivität von NGF wurde intensiv bei der Maus untersucht, weil in der submandibulären Drüse der Maus außergewöhnlich hohe Konzentrationen von NGF vorhanden sind.

β -NGF

Das Gen für das ausgereifte NGF der Maus, als β -NGF bekannt, umfasst mehr als 43 kb und besteht aus 5 Exons, die durch 4 Introns getrennt sind (Selby et al., 1987b). Das NGF-Gen existiert sowohl bei der Maus, als auch beim Menschen als eine einzelne Kopie des Genoms und ist bei der Maus auf dem Chromosom 3 und beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert (Francke, 1983; Zabel et al., 1985).

Bei der Maus existieren zwei große und zwei kleine Transkripte von β -NGF (Selby et al., 1987b). Eines der großen Transkripte (Transkript A, welches den langen Precursor kodiert) wird überwiegend in der submaxillären Drüse der Maus und in der Plazenta anderer Spezies nachgewiesen, während das andere große Transkript (Transkript B, welches den kleinen Precursor kodiert) in anderen Geweben dominiert. Beide Precursoren enthalten die gleiche NGF-Code-Sequenz nahe ihrer 3'Enden und differieren am 5'Ende. Die zwei kleineren Transkripte sind den zwei größeren ähnlich: Transkript C ähnelt A und Transkript D ähnelt B. In der submaxillären Drüse der Maus überwiegt Transkript A, in den meisten anderen Geweben überwiegt Transkript B. In dieser Drüse der Maus beträgt der Anteil der Transkripte C und D weniger als 1% der NGF mRNA, aber im Kortex und Herzen immerhin 5%-10% der gesamten NGF mRNA. In anderen Geweben sind beide kleinen Transkripte nur spärlich nachweisbar. Alle Transkripte enthalten am 3'-Ende dieselbe Sequenz für das reife NGF. Die Funktion der verschiedenen Precursoren und das Überwiegen verschiedener Formen in verschiedenen Geweben sind bisher noch unklar.

Es war Jahre lang sehr schwierig, die Biosyntheseschritte von β -NGF mittels Immunopräzipitation zu untersuchen, denn die gegen das ausgereifte NGF gerichteten Antikörper waren selten in der Lage, den NGF-Precursor oder seine Zwischenprodukte zu präzipitieren, insbesondere in zellfreien Translations-Systemen (Dicou et al., 1986; Thoenen und Barde, 1980). Das β -NGF-Protein wird als langer Precursor (prepro-NGF) synthetisiert, der am N- und C-Ende zum ausgereiften NGF entwickelt wird. Ein relativ stabiler Precursor mit einem Molekulargewicht von 22000 wurde nachgewiesen (Berger und Shooter, 1977). Durch Anwendung verschiedener Antikörper haben Darling et al. (1983) eine Vielzahl von β -NGF Vorläufern identifiziert mit Molekulargewichten von 35000, 29000, 22000, 19000 und 13000 MW. Das ausgereifte β -NGF-Molekül entsteht durch Spaltung bei Lys-Arg (-2 zu -1) am N-Ende und zwischen Arg-Arg bei 118-119 am C-Ende.

γ -NGF

Die Biosynthese der γ -Untereinheit stammt vom mGK-3 Gen (Evans und Richards, 1985) als einkettiges Zymogen, welches die Spaltung am N-Ende eines Peptides zur Aktivierung benötigt. Es wird dann, wie schon erwähnt, in 2- und 3-kettige Formen gespalten.

Die γ -Untereinheit scheint für die Entwicklung des β -NGF-Precursors durch Spaltung am N-Ende des pro-NGF wichtig zu sein. Berger und Shooter (1977) wiesen die Spaltung des 22000 Molekulargewicht Precursors zum NGF-Molekül durch die γ -Einheit nach. Ebenso wurde in vitro nachgewiesen, dass die γ -Einheit Zwischenprodukte von 22000 und 18000 Molekulargewicht, sowie ausgereiftes NGF aus den 34000 und 29000 MW Precursor produzieren kann (Jongstra-Bilen et al., 1989). Edwards et al. (1988a; 1988b) zeigten, dass sowohl der lange, als auch der kurze Precursor zum ausgereiften β -NGF durch stöchiometrische Mengen an der γ -Untereinheit gespalten werden.

α -NGF

Die α -Untereinheit wird vom mGK-4 Gen synthetisiert (Evans und Richards, 1985). Die prepro- α -Untereinheit ist ein einkettiges Molekül von 30000 Molekulargewicht, während die pro- α -Untereinheit glykolysiert ist und ein Molekulargewicht von 32000 hat (Darling et al., 1983). Die pro- α -Untereinheit wird an zwei Stellen gespalten und wird somit zum ausgereiften α -NGF, welches als Ketten mit 16000 und 10000 Molekulargewicht existiert und durch Disulfidbrücken verbunden ist. Im Gegensatz zu der γ -Untereinheit, wird die α -Untereinheit keiner Zymogen-

Aktivierung unterzogen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass an der Position -1 Arginin durch Glutamin substituiert wird und am N-terminalen Ende vier Aminosäuren fehlen (Isackson und Brandshaw, 1984; Isackson et al., 1984). Diese Unterschiede haben wahrscheinlich den Verlust der biologischen Funktion zur Folge.

3.4 Rezeptoren von NGF

Die Wirkungsentfaltung von NGF findet über die Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren statt, von denen zwei Arten bekannt sind. Der Rezeptor p75 mit niedriger Affinität (~75 kDa), der auch alle anderen Neurotrophine binden kann. Dieser Rezeptor gehört zu der Familie der Zytokin-Rezeptoren, zu der auch zwei TNF Rezeptoren, das Fas Antigen, die T-Zell Antigene OX40, CD27 und 4-1BB, sowie die B-Zell Antigene CD40 und CD30 gehören (Mallett und Barclay, 1991). Er hat eine niedrigere Affinität und eine schnelle Ablösung von NGF. Die zweite Rezeptorklasse gehört zu der Familie der Tyrosin Kinase Rezeptoren und zeigt eine höhere Spezifität für seine Liganden (transmembranöse Tyrosinkinase ~140 kDa) (Barbacid, 1993; Green et al., 1986; Meakin und Shooter, 1992). Diese Klasse hat überlappende Spezifitäten im Hinblick auf die Bindung von Neurotrophinen. TrkA bindet selektiv NGF und scheint für das Erreichen der vollen biologischen Wirkung notwendig zu sein (Hempstead et al., 1991; Kaplan, 1991b; Klein et al., 1991a; Loeb et al., 1991). TrkB bevorzugt die Bindung von BDNF und NT-4/5 (Ip et al., 1993) und TrkC zeigt eine hohe Affinität zu NT-3 und scheint seine biologische Wirkung zu vermitteln (Ip et al., 1993; Lamballe et al., 1991).

Wie die beiden Rezeptoren miteinander agieren ist noch nicht vollständig verstanden. Die Tyrosin Kinase Aktivität von TrkA erscheint auch ohne die Anwesenheit von p75, zumindest in mit TrkA transfizierten Zellen, was die Vermutung nahe legt, dass die Signaltransduktion von TrkA nicht den p75-Rezeptor benötigt (Klein et al., 1991a; Kaplan et al., 1991a). Aber in einigen Untersuchungsreihen wurde auch beobachtet, dass p75 als Co-Rezeptor für die Funktion der Trk-Rezeptoren fungiert

(Barker und Shooter, 1994; Hantzopoulos et al., 1994; Mahadeo et al., 1994; Verdi et al., 1994). Zum Beispiel konnte die Transfektion von p75-Rezeptor cDNA in PC12 Zellen, die zuvor Rezeptor-negativ waren, die Bildung beider Rezeptortypen induzieren (Hempstead et al., 1989). Auch bei Medulloblastomzellen, die nicht auf NGF ansprechen, bewirkte die p75 Transfektion sowohl die Bildung beider Rezeptor-Typen, als auch die Ansprechbarkeit dieser Zellen auf NGF

(messbar durch die gesteigerte Produktion von c-fos mRNA) (Pleasure et al., 1990). Zumindest in einigen Zellen scheinen TrkA und p75 miteinander zu agieren, um die High-Affinity-Bindung von NGF zu optimieren. In einigen Studien wurde gezeigt, dass der p75-Rezeptor mit dem TrkA-Rezeptor interagiert und dabei die Aktivität der intrazellulären Signale des TrkA bremsen oder steigern kann (Barker, 1998; Bibel et al., 1999; Ip et al., 1993; MacPhee und Barker, 1997). In einigen Untersuchungsreihen wurde gezeigt, dass für NGF die Bindung an den TrkA-Rezeptor durch p75 gesteigert wird (Barker et al., 1994; Hantzopoulos et al., 1994; Mahadeo et al., 1994; Verdi et al., 1994). Andererseits wurde aber auch gezeigt, dass der p75-Rezeptor die Internalisierung des NGF-TrkA-Komplexes reduzieren kann (Gargano et al., 1997). Der Nachweis der Rezeptor-Expression verschiedener Zellen konnte mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden gelingen: Bindung durch markiertes ^{125}I -NGF, durch monoklonale Antikörper gegen den Rezeptor, in situ Hybridisierung mit Nachweis von mRNA, die die verschiedenen Rezeptorarten kodiert, und durch den retrograden Transport entweder des ^{125}I -NGF oder des monoklonalen Antikörpers gegen p75 (als Review siehe Barker und Murphy, 1992).

Der p75-Rezeptor

(als Review siehe Barker und Murphy, 1992)

Über die Entwicklung monoklonaler Antikörper konnte der p75-Rezeptor charakterisiert werden, wovon vor allem der ME20.4 Antikörper zur Analyse der p75- Expression beim Menschen und Primaten genutzt wird (Ross et al., 1984).

Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domäne. Es ist aber auch eine abgespaltene, lösliche Form des Rezeptors beschrieben worden, die anscheinend die extrazelluläre Domäne enthält (DiStefano und Johnson, 1988). Diese abgespaltene Form wird in vitro von Schwannschen Zellen, PC12 Zellen, sympathischen Neuronen vom Zervikalganglion und in vivo im Urin, Plasma und in Amnionflüssigkeit beim Menschen und Ratten gefunden (DiStefano und Johnson, 1988; Zupan et al., 1989). Seine physiologische Bedeutung ist nicht geklärt, aber NGF, BDNF und NT-3 gehen Bindungen auch mit dieser Form ein (Rodriguez-Tébar et al., 1990; Squinto et al., 1991). Außer der Interaktion mit dem Trk-Rezeptor hat der p75-Rezeptor auch eine eigene Signal-Wirkung. Seine intrazelluläre Domäne, die als „death domain“ bezeichnet wird, wirkt als apoptotischer Faktor (Casaccia-Bonfil et al., 1996; Frade et al., 1996; Majdan et al., 1997). Vom p75-Rezeptor

wurde nachgewiesen, dass er die Apoptose in kultivierten sympathischen Neuronen (Bamji et al., 1998), Motoneuronen (Sedel et al., 1999), sensorischen Neuronen (Barrett und Bartlett, 1994) und Oligodendrozyten (Casaccia-Bonnel et al., 1996) induziert.

Der p75-Rezeptor wurde in vielen neuralen und nicht-neuralen Geweben nachgewiesen (Review von Barker und Murphy, 1992). Er wird in Neuronen, die NGF-abhängig sind, *in vitro* und *in vivo* exprimiert. Sensorische und sympathische Neurone des Neuralkammes, sowie cholinerge Neurone im reifen ZNS. Während der Embryonalentwicklung ist p75 in parasymphatischen Ganglien, im Pons und in der Medulla zu finden. Aber auch in nicht-neuralen Zellen ist p75 reichlich vertreten, in Zähnen, Hoden, im Thymus, im Tractus opticus, in Schwannschen Zellen und in epithelialen Zellen um Haarfollikel (Barker und Murphy, 1992). Welche Rolle dieser Rezeptor in diesen vielen nicht-neuralen Geweben spielt ist unbekannt.

NGF Applikation führt zur Überexpression der p75 mRNA *in vitro* und steigert die Anzahl beider Rezeptorenarten (p75 und TrkA) in PC12 Zellen (Bernd und Greene, 1984). *In vivo* steigert NGF die Menge an p75 mRNA in cholinergen Neuronen des ZNS (Higgins et al., 1989), sowie in sensorischen und sympathischen Zellen (Miller et al., 1991).

Der Trk-Rezeptor

Vom Trk Rezeptor ist bekannt, dass er notwendig ist, um die volle biologische Wirkung von NGF zu vermitteln (bei NGF ist es der TrkA). Über die Bindung des NGF an den Rezeptor wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt. Es kommt zur Rezeptor-vermittelten Endozytose, wobei der Rezeptor-NGF-Komplex als Vesikel retrograd zu den Zellkörpern transportiert wird und dort über die Phosphorylierung anderer Proteine im Zellkern die Gentranskription verschiedener Proteine und Enzyme induziert (Ehlers et al., 1995; Grimes et al., 1996; Hendry et al., 1974a; Korsching und Thoenen, 1983; Stöckel et al., 1975).

Verge et al. (1989; 1992) fanden, dass im adulten Organismus ca. 40% der Neurone der dorsalen Wurzelganglien den TrkA-Rezeptor exprimieren. Mu et al. (1993) stellten fest, dass der TrkA von kleinkalibrigen Neuronen exprimiert wird, die ca. 40% der dorsalen Wurzelganglien thorakal und lumbal ausmachen. Außerdem fanden sie die Isoformen TrkB und TrkC auf Neuronen größeren Durchmessers bei knapp 10% der Neuronenpopulationen.

McMahon et al. (1994) untersuchten ausgereifte sensorische Neurone bei adulten Ratten auf alle drei Isoformen hin. Auch sie fanden, dass $\frac{3}{4}$ der TrkA-positiven dorsalen Wurzelganglien einen kleinen Durchmesser haben ($<30\mu\text{m}$). Die meisten davon sind nicht myelinisiert und innervieren

periphere Nociceptoren, was dann wiederum die Schmerzentstehung durch NGF über den TrkA-Rezeptor erklären würde. Der TrkC-Rezeptor wurde von McMahon fast ausschließlich bei großkalibrigen Neuronen gefunden (90% >30µm). Die meisten von ihnen stellen Aβ-Fasern dar und innervieren Rezeptoren mit niedriger Schwelle in Haut und Muskulatur. TrkC bindet speziell NT-3, was reichlich in peripheren Geweben anzutreffen ist (Maisonpierre et al., 1990; Rosenthal et al., 1990).

In viszeralen Afferenzen von Beckennerven sind TrkA und TrkB in fast allen Nervenzellen anzutreffen, aber kein TrkC (McMahon et al., 1994). Dafür war in den Muskelafferenzen reichlich TrkB und TrkC anzutreffen und selten TrkA. Die Afferenzen der Haut zeigen Nervenzellen mit allen drei Rezeptortypen.

Im ZNS werden sowohl der TrkA- als auch der p75-Rezeptor in den cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns exprimiert (Holtzman et al., 1992; Holtzman et al., 1995; Koh und Higgins, 1991).

Der für NGF spezifische Rezeptor TrkA ist nicht nur bei Nervenzellen, sondern auch bei einer Vielzahl nicht-neuronaler Zellen zu finden. Hieraus erklärt sich die Wirkung von NGF auch auf Zellen des Immunsystems und des endokrinen Systems.

CD4⁺T-Helfer Zell-Klone bei Mäusen exprimieren den biologisch aktiven TrkA-Rezeptor, wenn sie durch ein Antigen aktiviert werden (Ehrhard et al., 1993b; Ehrhard et al., 1994). Auf menschlichen B- und T-Lymphozyten (Otten et al., 1989) sowie Monozyten (Ehrhard et al., 1993a) im Blut ist der TrkA beim Menschen nachgewiesen worden. Der hochaffine Rezeptor für NGF wird auch auf Mastzellen exprimiert (Horigome et al., 1993).

Die synovialen Fibroblasten beim Menschen exprimieren sowohl unter physiologischen, als auch unter entzündlichen Bedingungen den TrkA-Rezeptor (Manni et al., 2003).

Basale Keratinozyten beim Menschen synthetisieren und exprimieren NGF (Pincelli et al., 1994) und tragen sowohl den TrkA- als auch den p75-Rezeptor (Johnson et al., 1986; Kaplan et al., 1991a).

3.5 Pro-NGF

Die Translation des NGF-Proteins findet durch alternative Spaltung der zwei großen Transkripte statt. So entstehen 34kDa und 27kDa prepro-NGF-Produkte (Precursor).

Auch andere Precursorformen von 31kDa, 24kDa und 53kDa sind *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden (Bresnahan et al., 1990; Dicou et al., 1986; Dicou et al., 1992; Edwards et al., 1988b; Lakshmanan et al., 1988; Reinshagen et al., 2000; Yiangou et al., 2002).

Prepro-NGF wird im endoplasmatischen Retikulum zu pro-NGF-Formen von 32kDa und 25kDa reduziert (Darling et al., 1983; Edwards et al., 1988b; Selby et al., 1987; Ullrich et al., 1983). Die N-Glykosylierung von pro-NGF steuert zur effizienten Proteinexpression bei (Suter et al., 1991) und ist wahrscheinlich für den Austritt des pro-NGF aus dem endoplasmatischen Retikulum wichtig (Seidah et al., 1996). Posttranslational wird pro-NGF sowohl am Amino-, als auch am Carboxyl-Ende verstoffwechselt und wird so zum reifen, biologisch aktiven NGF mit 13.2kDa (Darling et al., 1983). Verschieden große Zwischenprodukte sind bei der Maus und der Ratte nachgewiesen worden. Dazu gehören Zwischenprodukte von 27-29kDa (Darling et al., 1983; Dicou et al., 1986), ein stabiles Zwischenprodukt von 22-24kDa (Berger und Shooter, 1977; Chen et al., 1997; Dicou, 1992) und von 18-19kDa (Darling et al., 1983; Dicou, 1989). In vielen Geweben, in denen zum Teil kein reifes NGF vorhanden ist, konnte pro-NGF nachgewiesen werden. Dicou et al. (1986) wiesen zwei verschiedene pro-NGF-Formen in der Schilddrüse und der Nebenschilddrüse bei Ratten nach. Chakrabarti et al. (1990) fanden bei diabetischen und gesunden ausgewachsenen Ratten sowohl NGF, als auch pro-NGF in der Retina. Dabei war die Nachweishäufigkeit und die Verteilung von NGF und pro-NGF bei beiden Gruppen gleich. Delsite und Djakiew (1999) wiesen in Stromazellen der menschlichen Prostata Precursoren mit 36kDa und 27kDa zusammen mit der teilweise weiter verstoffwechselten pro-NGF-Form von 22kDa nach. Im Gegensatz dazu war das reife β -NGF nicht vorhanden. Pro-NGF konnte bei Ratten in den Hinterhornanglien, im Rückenmark selbst, im Kolon (Reinshagen et al., 2000), sowie in Haarfollikeln (Yardley et al., 2000) nachgewiesen werden. Yiangou et al. (2002) untersuchten Nervengewebe der Haut von Patienten und Ratten mit subklinischer diabetischer Neuropathie und wiesen einen 53kDa großen Precursor nach, der wahrscheinlich dem prepro-NGF entspricht. Dieser Precursor war bei den Patienten mit diabetischer Neuropathie erniedrigt. Die Untersucher konnten zusätzlich zeigen, dass interessanterweise im entzündlich veränderten Kolongewebe von Patienten mit Morbus Crohn das 53kDa Molekül vermehrt exprimiert wurde. Nicht nur in peripheren Geweben, sondern auch im ZNS ist pro-NGF vorhanden. Im Gehirn bei Mäusen, Ratten und auch beim Menschen existiert ein 32kDa pro-NGF und nur geringe Mengen an reifem NGF (Fahnestock et al., 2001). Bei Morbus Alzheimer wurden in den Neuronen des basalen Vorderhirns deutlich höhere Mengen an pro-NGF als bei Gesunden gefunden

(Fahnestock et al., 2001). Peng et al. (2004) konnten eine Korrelation zwischen der zunehmenden Höhe von pro-NGF im parietalen Cortex bei Alzheimerpatienten und der Abnahme kognitiver Fähigkeiten aufzeigen.

Die Funktion der Precursoren und ihrer Zwischenprodukte ist bisher noch nicht gut verstanden. Zunächst nahm man an, dass der Precursor lediglich eine Vorstufe in der Entstehung von NGF ist und keinerlei biologische Aktivität besitzt. Aber im Laufe vieler Untersuchungsreihen stellte sich heraus, dass pro-NGF und seine Zwischenprodukte durchaus biologisch wirksam sein können. Bei Morbus Alzheimer degenerieren cholinerge Neurone, die NGF internalisieren und axoplasmatisch transportieren. Folglich müsste reifes β -NGF akkumulieren. Bei dieser Erkrankung wurde aber in erhöhten Konzentrationen pro-NGF nachgewiesen, während β -NGF nicht nachweisbar war (Fahnestock et al., 2001). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass pro-NGF im Gehirn die biologisch aktive Form ist.

Weitere Studien zeigten, dass pro-NGF biologische Aktivität besitzt. In Bioassays mit PC12 Zellen und Neuronen förderten NGF-Precursoren unterschiedlicher Länge das Neuritenwachstum (Lakshmanan et al., 1989; Saboori und Young, 1986; Suter et al., 1991). Chen et al. (1997) gewannen aus runden Spermatozoen der Ratte pro-NGF in der Molekülgröße von 31kDa und 22kDa. Der größere Precursor förderte das Neuritenwachstum bei PC12 Zellen und zusätzlich auch das Überleben von Sertolizellen. Der kleinere Precursor war biologisch weniger wirksam. Rekombiniertes, spaltungsresistentes pro-NGF konnte das Wachstum von Neuriten sowohl an PC12 Zellen, als auch an sympathischen zervikalen ganglionären Neuronen und ihr Überleben bewirken (Fahnestock et al., 2004). Dabei war die biologische Aktivität im Vergleich zu β -NGF um ca. das Fünffache niedriger. Andere Untersucher fanden die neurotrophe Aktivität von pro-NGF ähnlich ausgeprägt wie beim ausgereiften β -NGF (Chen et al., 1997; Rattenholl et al., 2001). Das synthetisierte pro-NGF bindet den TrkA-Rezeptor und löst die Phosphorylierung in nahezu derselben Aktivität wie das reife NGF aus (Fahnestock et al., 2004). Die beschriebenen Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass pro-NGF neurotroph wirksam ist. Im Gegensatz dazu, wiesen Lee et al. (2001) bei ihrem rekombinierten pro-NGF eine vermehrte Apoptose bei primären sympathischen zervikalen Ganglion-Neuronen und glatten Muskelzellen nach. Dieses pro-NGF hatte eine deutlich höhere Affinität zum p75-Rezeptor als β -NGF, konnte aber keine Bindung mit dem TrkA eingehen.

Nach experimentellen Läsionen von corticospinalen Neuronen bei Ratten wird die Expression von p75 deutlich gesteigert und die Apoptose beschleunigt (Giehl et al., 2001). Harrington et al.

(2004) induzierten durch Axotomie der Capsula interna den vermehrten Untergang corticospinaler Neurone bei Ratten. Auch in dieser Studie war die Expression des p75-Rezeptors erhöht. Bei Tieren, die homozygot für das Fehlen des p75-Gens sind, war der Zelltod dieser Neurone vollständig unterbunden. Gleichzeitig viel eine deutliche Erhöhung von pro-NGF in der cerebrospinalen Flüssigkeit auf. Bei Zugabe dieser cerebrospinalen Flüssigkeit zu Oligodendrozyten in Kultur kam es zu vermehrtem Zelltod. Somit scheint das pro-NGF biologisch aktiv zu sein. Bei Gabe von Antikörpern, die die Bindung von pro-NGF an den p75-Rezeptor verhinderten, war der Zelluntergang nahezu vollständig aufgehoben. Ähnliche Ergebnisse bestanden nach Läsionen des Rückenmarks (Beattie et al., 2002). Demzufolge scheint pro-NGF der physiologische Ligand für den p75-Rezeptor unter pathologischen Bedingungen zu sein. Über diese Bindung wird die Apoptose geschädigter Nervenzellen gesteigert. Sortilin (ein Rezeptor vorrangig für Neurotensin) scheint als ein Co-Rezeptor bei der pro-apoptotischen Wirkung von pro-NGF und p75 zu fungieren (Nykjaer et al., 2004). Welche Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen NGF und pro-NGF bestehen und wie sich die Balance beider bezüglich Apoptose und Überleben von Zellen verhält, ist noch offen und bedarf weiterer Untersuchungen.

3.6 NGF-induzierte Genaktivierung über Transkriptionsfaktoren

Die Bindung von NGF an den p75-Rezeptor aktiviert die zelluläre Sphingomyelinase, die dann nach Hydrolyse zu einer erhöhten Ceramid-Produktion führt (Dobrowsky et al., 1994; Dobrowsky et al., 1995). Ceramid ist in verschiedene neuronale Mechanismen involviert, die durch die Bindung von Neurotrophinen an den p75-Rezeptor ausgelöst werden. Je nach Höhe der Ceramidproduktion werden „second messenger“ aktiviert oder inhibiert, so dass ein bidirektionaler Weg (gesteigertes Überleben oder Apoptose) möglich ist (Satoh et al., 1988). Die Bindung von NGF an seine Rezeptoren TrkA und p75 initiiert zum Teil vielfach verzweigte Signaltransduktionskaskaden, an deren Ende meist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) stehen. Transkriptionsfaktoren sind Proteine die mit spezifischen Bindungsstellen innerhalb der Genkontrollregionen (Promotor, Enhancer) interagieren und über die Gentranskription das gesteigerte Überleben/Zytoprotektion und Differenzierung sicherstellen. Einige der NF- κ B vermittelten Funktionen steuern zur angeborenen und erworbenen Immunität bei, andere zur embryonalen Entwicklung, andere wiederum zum Zelltod (Wallach et al., 2002).

NGF vermittelt über die Bindung an seine Rezeptoren die NF- κ B Aktivierung nicht nur in neuronalen Strukturen. Zum Beispiel bewirkt die Bindung von NGF an den p75-Rezeptor in Fibroblasten eine NF- κ B Aktivierung. NF- κ B ist in fast allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Er ist meist im Zytoplasma an spezifische Inhibitorproteine, sogenannte I κ B's gebunden und inaktiv. Unterschiedliche Stimuli verursachen eine Aktivierung des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes, der dann wiederum I κ B phosphoryliert. Nach Bindung an Ubiquitin, Degradation und proteolytischer Spaltung wird NF- κ B freigesetzt und in den Zellkern transportiert. Dort bewirkt er als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (wie TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), die Expression von Adhäsionsmolekülen und auch von vielen Akute-Phase-Proteinen. Matrix-abbauende Enzyme wie die Matrix-Metalloproteinase 1 (Kollagenase 1) und Matrix-Metalloproteinase 3 (Stromelysin), die bei der arthritischen Gelenkzerstörung beteiligt sind (Bondeson et al., 1999), besitzen in ihren Genkontrollregionen Bindungsstellen für NF- κ B.

Zur Aktivierung von NF- κ B führen -neben Wachstumsfaktoren wie NGF- virale und bakterielle Infektionen, Zytokine (z.B. TNF und IL-1), chemische und physikalische Reize noxischer Intensität (z.B. UV- und ionisierende Strahlung) und Stimulierung des B- und T-Zellrezeptorsystems.

Einige der Mechanismen der NGF-induzierten Genaktivierung laufen über Ras-Proteine, einige nicht. Über die Aktivierung der Ras-Proteine wird eine Proteinkinase-Kaskade in Gang gesetzt, die zur raschen Transkription von Genen (early-response genes, ERGs) führt. Diese wiederum regulieren über ihre Transkriptionsfaktor-Produkte andere Gene (late-response genes, LRGs). Ein Beispiel für die ERGs sind c-fos und c-jun, die nach ihrer Transkription wiederum einen weiteren Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren. Die verschiedenen Mechanismen sind aber nicht linear zu betrachten, sondern sind zum Teil miteinander verknüpft und in ein hochkompliziertes Netzwerk eingebunden, das dann zu Immunantworten, Zellprotektion oder Zelltod, Differenzierung und Mitogenese führt.

Die verschiedenen Kaskaden sind zu komplex, um sie hier detaillierter zu beschreiben, deshalb sei der Leser auf verschiedene Reviews verwiesen (Mamidipudi und Wooten, 2002; Szeberényi, 1996; Wallach et al., 2002). Die Erkenntnis über die verschiedenen Mechanismen der Signalproteine und über die „Entscheidungsmöglichkeiten“ des Systems, welcher Weg (Zelltod oder Protektion) eingeschlagen wird, ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse. Es birgt ein

enormes therapeutisches Potential bei neurodegenerativen, neuromuskulären und autoimmunen Erkrankungen.

3.7 Antagonisten

Antagonisten dienen zum einen dem besseren Verständnis der verschiedenen Wirkungen von NGF, zum anderen stellen sie potentielle therapeutische Strategien dar. Außerdem war die Entwicklung von Antikörpern für viele Nachweißverfahren für NGF notwendig. Dabei sind zwei verschiedene Ansätze zu unterscheiden: Antagonisten gegen den TrkA-Rezeptor und Antagonisten, die NGF neutralisieren. Es sei hier nur auf einige Vertreter verwiesen.

K-252a

Dieser Antagonist, von dem eine Wirkung auf den TrkA-Rezeptor angenommen wird, ist bekannt, dass er in PC12 Zellen verschiedene Wirkungen von NGF inhibiert (Koizumi et al., 1988). Dabei ist er so selektiv, dass zwischen den Wirkungen von NGF und denen anderer Effektoren, wie zum Beispiel Epidermal Growth Factor (EGF) unterschieden werden kann (Koizumi et al., 1988). Er inhibiert durch NGF induzierte Mechanismen, wie schnell auftretende membranbasierte Wirkungen (Contreras und Guroff, 1987), sowie auf der Ebene der Transkription die Produktion von Enzymen (Huff et al., 1981) und ebenso die durch NGF induzierte Absenkung einiger spezifischer zellulärer Phosphorylierungsmechanismen (End et al., 1983). Die Wirkungsweise des K-252a ist nicht ganz klar, denn er hat weder Einfluss auf die Bindung von NGF an die PC12 Zellen noch auf die Internalisierung von NGF in diese Zellen (Koizumi et al., 1988). Die Wirkweise dieses Antagonisten zielt auf den Rezeptor, da die schnellen membranbasierten und von der Transkription unabhängigen Wirkungen von NGF inhibiert werden (Koizumi et al., 1988). Unter dem Einfluss von NGF differenzieren sich PC12 Zellen zu sympathischen Neuronen-ähnlichen Zellen mit Aussprossung von Neuriten. K-252a konnte diese NGF-Wirkung komplett unterbinden, bzw. die schon durch NGF induzierte Neuritenaussprossung wieder rückgängig machen (Koizumi et al., 1988). Bei Anwendung des Antagonisten K-252a bei Tiermodellen für Psoriasis konnten eindeutige Besserungen der psoriatischen Hautveränderungen gezeigt werden (Raychaudhuri et al., 2001; Raychaudhuri et al., 2004).

MNAC13

Bei diesem Antagonisten handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der gegen menschliches TrkA gerichtet ist, aber auch den Rezeptor bei Ratten erkennt. Er bindet an die extrazelluläre Domäne des TrkA und interagiert nicht mit TrkB und TrkC (Cattaneo et al., 1999). Durch die Implantation von TrkA Antikörper sezernierenden Zellen in das Vorderhirn von Ratten (Molnar et al., 1997; Molnar et al., 1998; Avignone et al., 1998) konnte die Wirkung von NGF auf die cholinergen Neurone im Vorderhirn inhibiert werden. Hierbei kam es zu einer erheblichen Reduktion der Größe und Anzahl dieser Neurone. Dabei war das entstehende neuronale Defizit größer als bei Knock-out-Mäusen, denen beide Allele des TrkA-Rezeptors fehlen (TrkA^{-/-}). Diese Knock-out-Mäuse haben eine deutlich niedrigere Reduktion der cholinergen Neurone, leben aber nur wenige Wochen, sodass der weitere Verlauf nicht beurteilt werden kann. Der Einsatz dieses Antagonisten wird auch in Zukunft weitere Informationen über die Wirkung der NGF-TrkA-Interaktion ermöglichen.

ALE-0540

Dieser Antagonist verhindert die Bindung von NGF an seinen TrkA-Rezeptor und den p75-Rezeptor, ohne an NGF selbst zu binden (Owolabi et al., 1999). Er inhibiert nicht nur die Bindung, sondern auch die Signaltransduktion und die biologische Antwort. Das durch NGF induzierte Neuritenwachstum dorsaler Wurzelganglienneurone wurde durch ALE-0540 verhindert (Dostaler et al., 1996). Außerdem zeigte ALE-0540 über den Antagonismus zu dem NGF-Rezeptor analgetische Wirkung bei Tiermodellen mit neuropathischen Schmerzen (durch Nervenligatur der spinalen Nerven L5 und L6) und entzündlichen Schmerzen (thermisch-induziert) (Owolabi et al., 1999). ALE-0540 könnte in Zukunft als analgetischer Wirkstoff bei neuropathischen und entzündlichen Schmerzzuständen zum Einsatz kommen.

NGF-neutralisierende Antikörper und TrkA-IgG Fusionsproteine

In verschiedenen Tiermodellen mit induzierter Entzündung konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper durch die Neutralisierung von NGF oder aber durch Blockierung des Rezeptors die Hyperalgesie reduzierten (Lewin et al., 1994; McMahon et al., 1995; Woolf et al., 1994). Im zentralen Nervensystem konnten anti-NGF Antikörper die Differenzierung cholinergener Neurone inhibieren (Vantini et al., 1989) und das Aussprossen Acetylcholinesterase-positiver Neurone im Hippocampus blockieren (Van der Zee et al., 1992; Van der Zee et al., 1995).

Die Gabe eines TrkA-Antagonisten **C(92-96)** oder eines monoklonalen anti-NGF Antikörpers **mAK NGF30** konnte bei adulten Ratten die vorbestehenden cholinergen präsynaptischen Neurone erheblich reduzieren (Debeir et al., 1999). Dies zeigt den noch erheblichen Einfluss von NGF auf das schon entwickelte, adulte Nervensystem.

3.8 Meßverfahren für NGF

Weil die Konzentrationen von NGF in Geweben und Körperflüssigkeiten im allgemeinen sehr niedrig sind, bedarf es hoch sensitiver Nachweisverfahren. Dabei muss zwischen den Nachweisverfahren unterschieden werden, die die NGF mRNA, das NGF Protein, oder nur die Anwesenheit von NGF mittels Anfärbung nachweisen, ohne dass eine genaue Quantifizierung möglich ist. Zusätzlich gibt es Verfahren, die NGF über seine biologische Wirksamkeit an Neuronen nachweisen. In vielen verschiedenen Untersuchungsreihen wurden zum Teil sehr unterschiedliche Konzentrationen von NGF nachgewiesen. Ein wichtiger Faktor war die Entwicklung von spezifischen Antikörpern, die nicht mit anderen Wachstumsfaktoren kreuzreagieren. Im Serum sind die Konzentrationen von NGF sehr niedrig. Dicou et al. (1993b) haben nur bei 11 von 108 gesunden Kontrollprobanden NGF im Serum nachweisen können. Sie vermuten, dass die Werte wegen der Bindung von NGF an das Serumprotein α_2 -Macroglobulin zu niedrig gemessen werden. Dieses Protein bindet Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, bFGF, β -NGF, PDGF und TGF- β . Die Zugabe von 1 M Guanidin zum Serum setzt das gebundene NGF frei (Murase et al., 1992), was die Messwerte um 1.8 fache Menge ansteigen lässt (Dicou et al. 1993b). Eine weitere mögliche Erklärung sind die von Dicou et al. beschriebenen natürlich vorkommenden NGF-Autoantikörper, die NGF im Serum binden können (Dicou et al., 1993b; Dicou et al., 1996).

Immunohistochemie

Mit diesem Verfahren wird NGF in Geweben mittels Antikörpern nachgewiesen und durch Färbeverfahren kenntlich gemacht. Dabei bindet sich der polyklonale oder monoklonale primäre Antikörper an NGF und wird dann mit einem sekundären, gefärbten Antikörper sichtbar gemacht (Piga et al., 2000; Pozza et al., 2000; Raychaudhuri et al., 1998; Raychaudhuri et al., 2000b; Tuveri et al., 1993). Man spricht dann von der Immunoreaktivität von NGF (NGF-IR) eines Gewebes. Der Nachteil bei diesem Verfahren ist die nicht mögliche Quantifizierung: im

Vergleich verschiedener Gewebe ist nur die Aussage eines vermehrten oder verringerten NGF-Nachweises möglich. Außerdem birgt die Bindung von polyklonalen Antikörpern auch die Gefahr der Kreuzreaktionen zu anderen Proteinen des Gewebes. Vorteile sind der mögliche Nachweis von Kolo-kalisationen bei Anwendung von Doppelfärbungen und die mögliche histologische Zuordnung, in welchen Zellen NGF vermehrt gefunden wird.

Bioassay

In diesem Nachweisverfahren wird der neurotrophe Effekt von NGF bestimmt. Hierfür wird die biologische Wirkung von NGF auf embryonale sensorische und ganglionäre Neurone, sowie auf PC12 Zellen gemessen (Aloe et al., 1992a; Ebendal, 1979; Green, 1977; Levi-Montalcini, 1987; Stephani et al., 1987; Suda et al., 1978). Bei diesem Verfahren dienen verschiedene Testseren als Kontroll- und Standard-Lösungen. Stephani et al. (1987) konnten mit diesem Bioassay NGF-Konzentrationen im Serum von $15 \geq$ pg/ml messen und berichteten über Serumkonzentrationen bei der Maus zwischen 200 und 1000 ng/ml. Die Untersucher verglichen in einer Studie verschiedene Bioassay-Systeme mit embryonalen sensorischen Kücken-neuronen, mit PC12 Zellen und mit embryonalen sensorischen Ganglienzellen von Küken miteinander (Stephani et al., 1987). Dabei war für die Messung des NGF im Serum von Mäusen, Ratten und Menschen der Bioassay mit den embryonalen sensorischen Ganglien am zuverlässigsten. Näher-Noè et al. (1993) überprüften die Spezifität des Bioassays mit dem monoklonalen anti-Maus NGF Antikörper MAB 27/21 in parallelen Proben, um die NGF abhängige neurotrophe Wirkung von anderen Faktoren zu unterscheiden. Sie erhielten in ihrem Bioassay eine Nachweisgrenze für NGF von 10-20 ng/l Zellkulturmedium.

Allerdings bedarf der Bioassay zeitraubender Zellkulturprozeduren und ist für die Messung einer großen Anzahl an Proben nicht gut geeignet.

Two-site enzyme-linked immunoenzymatic assay (ELISA)

Dabei wird NGF von kommerziell erhältlichen Anti-NGF-Antikörpern (zum Beispiel der monoklonale Maus-Antikörper 27/21, oder rekombinierte menschliche Antikörper) gebunden. Monoklonale Antikörper haben den Vorteil, dass sie spezifischer als polyklonale Antikörper sind. Mit diesem Antikörper werden Platten inkubiert, die dann das NGF aus den zu untersuchenden Proben binden. Mittels verschiedener Standardlösungen als Vergleich ist eine genaue Quantifizierung des NGF-Proteins auch beim Menschen möglich (Korsching und Thoenen, 1987;

Murase et al., 1991; Söderström et al., 1990; Weskamp und Otten, 1987). Für Untersuchungen von menschlichem NGF sind kommerzielle two-site ELISA Kits (z. B. R&D Systems und Roche) erhältlich.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Bei der RT-PCR wird die komplementäre DNA (cDNA) vervielfältigt und gemessen (Iannone et al., 2002; Yamamoto et al., 2001). Diese Messmethode weist die mRNA und nicht das NGF Protein nach. Dabei sind genaue Quantifizierungen möglich. Ob allerdings nach dem ersten Schritt der mRNA Bildung tatsächlich in vivo das NGF Protein gebildet worden wäre, bleibt offen und somit ein Unsicherheitsfaktor. Ein RT-PCR-System für Messungen bei menschlichen Proben ist ebenfalls kommerziell (Promega) erhältlich.

Western Blot

Bei diesem Messverfahren werden die Eiweiße der zu untersuchenden Probe elektrophoretisch aufgetrennt und auf mit Gel beschichtete Platten übertragen (Kang et al., 1995; Melamed et al., 1996). Die Zugabe von spezifischen NGF-Antikörper binden das NGF-Protein und weisen es immunohistochemisch nach. Es ist lediglich eine Aussage über vermehrte oder verringerte NGF-Konzentrationen und nicht eine genaue Quantifizierung möglich.

Northern blot

Mit dieser Methode kann die mRNA für NGF oder seine Rezeptoren nachgewiesen werden. Die gesamte RNA der Probe wird elektrophoretisch aufgetrennt und auf Gelmembranen übertragen. Nach Hybridisierung wird die mRNA mit Hilfe einer radioaktiv markierten DNA-Sonde nachgewiesen (Chirgwin et al., 1979; Melamed et al., 1996; Zhu et al., 1999). Auch diese Methode weist nur den ersten Schritt der NGF-Transkription und nicht das Protein nach.

In situ Hybridisierung

Bei diesem Nachweisverfahren hybridisiert man markierte Anti-Sense-RNA-Sonden mit der RNA einzelner Zellen oder Gewebeproben. Dieses Messverfahren ist besonders bei Untersuchungsreihen wertvoll, bei denen das Vorkommen des NGFs in verschiedenen Geweben untersucht wird (Freemont et al., 2002; Gigante et al., 2003; Zhu et al., 1999). Die in situ Hybridisierung dient nicht der genauen Quantifizierung von NGF mRNA in Körperflüssigkeiten.

3.9 Die Familie der Neurotrophine

NGF gehört zu einer Familie von Substanzen, die als Neurotrophine bezeichnet werden und in ihrer Struktur verwandt sind. Dazu gehören Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Leibrock et al., 1989), Neurotrophin-3 (NT-3) (Ernfors et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990), NT-4/5 (Berkemeier et al., 1991; Hallbook et al., 1991), NT-6 (Götz et al., 1994; Jelsma und Aguayo, 1994; Korsching, 1993; Lindsay et al., 1994) und NT 7 (Review siehe Sofroniew et al., 2001).

Strukturell weniger verwandte Proteine mit trophischen Effekten auf neuronale Zellen sind Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) (Adler et al., 1979; Finn und Nishi, 1996; Lin et al., 1989; Stöckli et al., 1989), Leukemia Inhibitory Factor/ Cholinergic Differentiation Factor (LIF/CDF) (Yamamori et al., 1989), Fibroblast Growth Factors (FGFs) (Walicke, 1988), Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Insulin-like Growth Factors (IGFs) (Aizenman et al., 1986; Baskin et al., 1987), Epidermal Growth Factor (EGF), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Fallon et al., 1984; Morrison et al., 1987) und Transforming Growth Factor-alpha sowie -beta (TGF- α/β) (Derynck, 1988; Fallon et al., 1990).

Zu einigen der verschiedenen Neurotrophinen sollen nur kurze Informationen gegeben werden. Eine ausführliche Beschreibung aller Neurotrophine wäre zu umfangreich. Der Leser sei auf die Referenzen verwiesen.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Dieses Neurotrophin hat seinen Namen dadurch, dass es zuerst im Schweinehirn isoliert wurde (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989). BDNF wirkt nicht auf sympathische Neurone, sondern auf sensorische Neurone der Plakode-Ganglien (aus denen sich die Riechzellen entwickeln) und sensorische Neurone des Neuralstammes. Er reguliert die Differenzierung von mittelgroßen, sensorischen Nervenfasern für die Wahrnehmung von mechanischem Druck (Ernfors et al., 1994b) sowie die Motoneurone (Sendtner et al., 1992). Im peripheren Nervensystem wird BDNF in den dorsalen Wurzelganglien synthetisiert, zu den zentralen Enden dieser primär afferenten Neurone transportiert, dort ausgeschüttet und interagiert dann mit dem TrkB-Rezeptor sekundärer sensorischer Neurone (Michael et al., 1997; Zhou und Rush, 1996). Er scheint eine wichtige Rolle als Neuromodulator in den spinalen Hinterhorn-Neuronen des Rückenmarks bei

Entzündungen zu spielen (Kerr et al., 1999; Mannion et al., 1999; Thompson et al., 1999). Exogen zugeführtes BDNF steigert die NMDA-induzierte Depolarisation im Rückenmark (Kerr et al., 1999). Intrathekal appliziertes NGF steigert die Expression von BDNF speziell in den TrkA-positiven Neuronen der dorsalen Wurzelganglien und in ihren zentralen Enden im Rückenmark (Michael et al., 1997). BDNF bindet an den TrkB-Rezeptor (Klein et al., 1991b). Mutationen im BDNF-Protein scheinen mit verantwortlich für psychiatrische (Egan et al., 2003) und neurodegenerative Erkrankungen, wie M. Alzheimer (Ventriglia et al., 2002) zu sein. Strukturanalysen zeigen zwischen NGF und BDNF mehr als 50% Homologie, was dafür spricht, dass beide zur selben Genfamilie gehören (Leibrock et al., 1989).

Neurotrophin-3 (NT-3)

Seine wachstumsfördernde Wirkung besteht hauptsächlich bei sympathischen Neuronen, großkalibrigen sensorischen Neuronen für Proprioception und Vibration sowie bei Motoneuronen (Ernfors et al., 1994a; Hory-Lee et al., 1993). NT-3 bindet zwar bevorzugt an den TrkC-Rezeptor, aber auch an TrkB und TrkA (Belliveau et al., 1997; Cordon-Cardo et al., 1991; Mischel et al., 2001). Er kann einige TrkA-assoziierten Funktionen in den dorsalen Wurzelganglien antagonisieren (Jongsma Wallin et al., 2001; Karchewski et al., 2002). NT-3 scheint an der Pathogenese der diabetischen Neuropathie mitzuwirken (Tomlinson et al., 1997). Die Gabe von NT-3 konnte in Tiermodellen für diabetische Polyneuropathie die experimentell induzierte, herabgesetzte Nervenleitgeschwindigkeit lindern (Anand et al., 1996).

Neurotrophin-4/Neurotrophin-5 (NT-4/5)

NT-4 und NT-5 sind als Varianten desselben Proteins gewertet worden, sodass meist von NT-4/5 berichtet wird (Berkemeier et al., 1991; Hallbook et al., 1991). Dieses Neurotrophin hat ein ähnliches Wirkspektrum wie BDNF (Friedman et al., 1995) und bindet ebenso an den TrkB (Klein et al., 1992), was die Ähnlichkeit der Wirkung erklärt.

Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

Dieser Faktor wurde aufgrund seiner Fähigkeit, ziliare Neurone im Kulturmedium am Leben zu erhalten, benannt (Barbin et al., 1984). Aber er wirkt auch auf eine Reihe anderer Neurone: auf einige sensorische Neurone der dorsalen Wurzelganglien (Lin et al., 1990), auf magnozellige

cholinerge Neurone im basalen Vorderhirn (Hagg et al., 1992), wo er auch die Expression des p75-Rezeptors fördert (Hagg et al., 1992), sowie auf Motoneurone (Arakawa et al., 1990).

Leukemia inhibitory factor (LIF)

LIF (auch als cholinergic differentiation factor -CDF- bekannt) ist ein pleiotropes Molekül mit einer Vielzahl von Effekten auf neuronale und nicht-neuronale Zellen, z. B. auch auf sensorische Neurone der dorsalen Wurzelganglien (Murphy et al., 1991) und Motoneurone (Martinou et al., 1992). Sein Rezeptor mit einer Ligand-bindenden- und einer Signal-Transduktions-Untereinheit gehört zu der Familie der Zytokin-Rezeptoren (Gearing et al., 1991; Gearing et al., 1992). Die Überlappung der Aktivitäten von LIF/CDF und CNTF führte zu der gemeinsamen Bezeichnung der Neurokine oder Neuropoetische Faktoren (Hall und Rao, 1992).

Fibroblast growth factors (FGF's)

FGF's sind charakterisiert worden durch ihre mitogene Wirkung auf eine Vielzahl von Zellen mesodermalen und ektodermalen Ursprungs (Rifkin und Moscatelli, 1989; Vlodavsky et al., 1991). Sie gehören zu einer Familie von sieben Wachstumsfaktoren, unter anderem der basic FGF (bFGF) und der acid FGF (aFGF). Der bFGF steigert das Überleben und die Differenzierung verschiedener neuronaler Zelltypen, wie zum Beispiel im ziliaren Ganglion (Eckenstein et al., 1990), einige sensorische dorsale Wurzelganglionneurone (Eckenstein et al., 1990), einige Neurone im Cerebellum (Hatten et al., 1988) und GABAerge Neurone im basalen Vorderhirn (Knüsel et al., 1991). In PC12 Zellen steigert bFGF die Bildung von p75 mRNA (Doherty et al., 1988). Außerdem steigert FGF die Ausschüttung von NGF in Astrozyten (Yoshida und Gage, 1991).

Glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

Dieser Faktor ist weit verbreitet in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen. Er ist ein potenter Wachstumsfaktor insbesondere für Motoneurone und dopaminerge Neurone des ZNS, sowie für sensorische, sympathische sowie parasympathische Neurone im peripheren Nervensystem (Buj-Bello et al., 1995). GDNF wird in allen Geweben exprimiert, die durch GDNF-positive Neurone innerviert werden (Buj-Bello et al., 1995). Er ist ein Mitglied der Familie der transforming growth factor- β (TGF- β) (Jing et al., 1996). In vitro kann die prolongierte Gabe von GDNF die Ausschüttung von Substanz P aus dorsalen Wurzelganglien deutlich erhöhen (Skoff et al., 2003).

Insulin-like growth factors (IGF`s)

Die IGF`s sind eine Familie strukturell und funktionell verwandter Proteine, einschließlich Insulin und der Isoformen IGF-I und IGF-II. Diese Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sind im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet (Neely et al., 1991). Ihre Funktion im peripheren Nervensystem ist noch nicht ganz verstanden, aber sie scheinen bei Nervenschädigung die Regeneration von Motoneuronen und sensorischen Nervenfasern zu unterstützen (Edwall et al., 1989; Glazner et al., 1993; Near et al., 1992; Recio-Pinto et al., 1986).

Die Interaktionen der Neurotrophine sind komplexer als zunächst angenommen. Sowohl die Neurotrophine, als auch ihre Rezeptoren haben teils überlappende, teils unterschiedliche Aktivitäten und sind in ihrer Gesamtheit notwendig für eine normale Entwicklung. Neurotrophine existieren in verschiedenen Formen und Untereinheiten, die verschiedene intra- und extrazelluläre Funktionen in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben haben. Die verschiedenen Rezeptoren haben zum Teil mehrere potentielle Liganden. Es existieren auch abgespaltene Rezeptorformen, die teils agonistisch, teils antagonistisch wirken. Alle diese Variablen stellen ein multidimensionales System dar.

3.10 NGF und das Nervensystem

Zunächst wurde ein wachstumsfördernder Effekt von NGF auf sich entwickelnde Neurone beim Embryo entdeckt. Es zeigte sich, dass während der embryonalen Entwicklung ein großer Anteil der Nervenzellen untergeht und ein anderer wiederum überlebt und sich weiter differenziert. Bei einigen peripheren Nervenfasertypen (sympathische Ganglien und sensorische Neurone) besteht eine Abhängigkeit von NGF und bei anderen nicht (Bennett et al., 2002). Das Prinzip der Embryonalentwicklung ist, dass Zellen des Neuralkammes einem Konzentrationsgradienten entgegenwachsen und nur solche Nervenvorläuferzellen sich differenzieren, die NGF über einen membranständigen Rezeptor internalisieren können. Der NGF-Rezeptor-Komplex bewirkt bei diesen Zellen im Zellkern eine komplexe Änderung der Transkription. Diejenigen Zellpopulationen, denen es nicht gelingt, NGF zu internalisieren, sterben ab. Dieser Vorgang wurde als programmierter Zelltod bzw. als Apoptose bezeichnet.

In vielen in vivo und in vitro Experimenten (als Review siehe Levi-Montalcini 1987) wurden weitere Erkenntnisse über NGF gewonnen. Zum Beispiel verursachten tägliche Injektionen von NGF (damals aus Schlangendrüsengift isoliert) in Hühnerembryonen ein überschießendes Wachstum der sensorischen und sympathischen Ganglien und eine exzessive Produktion ihrer Fasern (Cohen und Levi-Montalcini, 1956). Die Applikation eines NGF-Antiserums in Neugeborene Nagetiere führte zu einem dramatischen Verlust der meisten sympathischen paravertebralen Ganglien (als Review siehe Levi-Montalcini 1987). Dieser Effekt unter Gabe von anti-NGF wurde als Immunosympathektomie bekannt bzw. definiert (Angeletti und Levi-Montalcini, 1971). Die Erkenntnis, dass die Immunosympathektomie durch die Beseitigung zirkulierender endogener NGF-Konzentrationen durch anti-NGF-Seren resultierte (Goedert et al., 1980), eröffnete die Frage, wie NGF seinen Wirkungsort erreicht. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass NGF in sensorischen und sympathischen Fasern retrograd mittels axoplasmatischem Transport zu den Zellkernen gelangt (Hendry et al., 1974a; Hendry et al., 1974b; Stöckel et al., 1975).

NGF besitzt die Fähigkeit, das Wachstum dieser Nervenzelltypen entlang seines Konzentrationsgradienten zu lenken, was als Neurotropismus bezeichnet wird (Campenot, 1982; Gundersen und Barrett, 1979).

Chromaffine Zellen und Phäochromozytomzellen (PC12 Zellen, eine geklonte Zellreihe aus einem Medullatumor bei Ratten) eigneten sich hervorragend zu Untersuchungen der biologischen Aktivität von NGF, unter anderem für die Modulierung phenotypischer Veränderungen dieser Zellen (Aloe und Levi-Montalcini, 1979; Greene und Tischler, 1976; Greene et al., 1983; Unsicker et al., 1978). Die Zugabe von NGF zu PC12 Zellen induzierte nämlich die Differenzierung dieser Zellen zu den sympathischen Neuronen ähnlichen Zellen: sie entwickelten Neuriten, wurden elektrisch erregbar (Greene und Tischler, 1976) und formten Synapsen mit Muskelzellen in Kultur (Schubert et al., 1977).

Zusammenfassend sind im Nervensystem 3 Hauptwirkungen von NGF zu unterscheiden:

1. vital notwendige Wachstumsförderung in der embryonalen Entwicklung

2. Induktion der Zelldifferenzierung

und 3. die Ausrichtung der wachsenden und/oder regenerierenden Neuriten entlang seines Konzentrationsgradienten.

NGF wirkt nicht nur auf das periphere Nervensystem, sondern wird auch im ZNS exprimiert. Die größten Mengen sind im Hippokampus und Cortex nachweisbar, wo die Hauptgebiete für

cholinerge Neurone im Bereich des Nucleus basalis magnocellularis und im medialen Septum liegen (Cimino et al., 1996; Korsching, 1986; Thoenen et al., 1987; Whittemore und Seiger, 1987). NGF und andere Neurotrophine wie BDNF, NT-3 und NT-4 regulieren das Überleben, die Differenzierung und die Erhaltung spezifischer neuronaler Populationen. Untersuchungen an neugeborenen und adulten Ratten zeigten, dass cholinerge Neurone im Corpus striatum und diejenigen, die im basalen Vorderhirn zum Hippocampus und Cortex projizieren, auf die exogene Gabe von NGF mit einer deutlichen und selektiven Steigerung der Cholinacetyltransferase (ChAT) reagieren (Fusco et al., 1989; Gnahn et al., 1983; Johnston et al., 1987; Mobley et al., 1985; Mobley et al., 1986). Diese cholinergen Neurone nehmen selektiv NGF auf und transportieren es retrograd zu den Zellkörpern (DiStefano et al., 1992; Domenici et al., 1994a; Seiler und Schwab, 1984), wo dann durch Induktion verschiedener Enzymtranskriptionen (zum Beispiel ChAT) weitere Mechanismen gefördert werden. NGF und andere Neurotrophine induzieren während der embryonalen Entwicklungsphase die Entstehung von Synapsen (Lewin und Barde, 1996). Aber auch beim voll entwickelten ZNS bewirkt die exogene Applikation von Neurotrophinen die Entstehung neuer Synapsen im zerebralen Cortex adulter Tiere (Cuello et al., 1994; Garofalo et al., 1992). Die Gabe von NGF in das Gehirn von Ratten schützt vor der Degeneration von geschädigten cholinergen Neuronen, vergrößert die Aktivität von unbeschädigten cholinergen Neuronen und verlangsamt die neuronale Degeneration bei alternden Ratten (Chen und Gage, 1995; Fisher et al., 1987). Die Atrophie cholinergischer Neurone nach Fimbria-fornix-Läsion bei Nagetieren und Primaten konnte mit der intraventrikulären Gabe von NGF verringert werden (Hefti, 1986; Koliatsos et al., 1990; Kromer, 1987; Tuszynski et al., 1990; Williams et al., 1986). Und umgekehrt konnte die Implantation von Zellen, die einen neutralisierenden anti-NGF-Antikörper sezernierten, in das basale Vorderhirn von Ratten die cholinergen Neurone des Vorderhirns in Zellzahl und -größe reduzieren (Cattaneo et al., 1999; Molnar et al., 1998). Dieser Effekt war transient und reversibel. Bei Implantation am 2. Lebensstag waren die neuronalen Defizite erheblicher als bei Implantation am 8. Lebensstag, oder später. Dies war ein Hinweis darauf, dass diese cholinergen Neurone nur in einer bestimmten Entwicklungsphase NGF benötigen und in weiteren Stadien diese NGF-Abhängigkeit abnimmt, vielleicht auch weil andere Neurotrophine an der Erhaltung dieses differenzierten Stadiums mitwirken.

Klinische Studien unterstützen die Hypothese, dass auch beim Menschen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der M. Parkinson und der M. Alzheimer NGF eine zentrale Rolle spielt (Coyle

et al., 1983; Eide et al., 1993; Holtzman et al., 1993; Liberini und Cuello, 1994; Scott und Crutcher, 1994), da bei diesen Erkrankungen die Degeneration cholinergischer Neurone des basalen Vorderhirnes und des Hippocampus (involviert beim M. Alzheimer) oder dopaminergischer Neurone des Globus pallidus und der Substantia nigra (involviert beim M. Parkinson) stattfindet.

3.11 NGF und Zellen des Immunsystems

Im Laufe weiterer Untersuchungen – insbesondere durch Verabreichung von exogenem NGF und NGF-Antikörpern – stellte sich heraus, dass NGF auch Wirkungen auf Zellen des endokrinen und immunologischen Systems hat und immunmodulierende Funktionen besitzt.

Menschliche Monozyten werden von NGF beeinflusst. Sie tragen den funktional aktiven TrkA-Rezeptor (Ehrhard et al., 1993a). Während der Differenzierung *in vitro* von menschlichen Monozyten zu Makrophagen nimmt die Expression von TrkA ab, was darauf hinweist, dass die Reifung von der Trk-Regulierung abhängig ist. Die Behandlung von Monozyten mit *Staphylococcus aureus* Cowan I (ein potenter Stimulator der Aktivierung von Monozyten) verursacht eine Dosis- und Zeit-abhängige Induktion der vermehrten Produktion von Trk mRNA und des funktionalen Rezeptor-Proteins (Otten et al., 1994). Dies spricht für eine Beteiligung des NGF-Trk-Systems an Immunprozessen, in die das Monozyten/Makrophagensystem involviert ist. Zudem induziert NGF die Interleukin-2-Rezeptoren auf menschlichen Monozyten (Brodie und Gelfand, 1992).

NGF fördert das Wachstum und die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen und stimuliert deren Produktion von IgM, IgA und IgG4 (Kimata et al., 1991; Otten et al., 1989). Sowohl die TrkA mRNA, als auch das Rezeptorprotein konnte in menschlichen B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Melamed et al., 1996). Die Bindung von NGF an den Trk-Rezeptor auf den B-Lymphozyten löst eine rasche Phosphorylierung anderer zellulärer Proteine aus (Melamed et al., 1996), was zur Zellproliferation führt. NGF mRNA wurde auch in B-Lymphozyten von Mäusen gefunden, wo sowohl eine Proteintranslation von NGF, als auch seine Sezernierung nachgewiesen werden konnte (Santambrogio et al., 1994). Nach Aktivierung der B-Lymphozyten ist die NGF-Synthese gesteigert (Torcia et al., 1996).

Ebenso wird durch NGF die Proliferation von T-Lymphozyten gesteigert, sowie die T-Zell abhängige Antikörpersynthese, die bei einigen Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt (Manning et al., 1985; Otten et al., 1989; Thorpe und Perez-Polo, 1987). Die Phänotypisierung der Lymphozyten wird aufgrund der zugehörigen CD-Oberflächenantigene vorgenommen. Die T-Helferzellen (TH) haben das Oberflächenantigen CD4. Sie haben bei Immunantworten eine wichtige Schlüsselrolle, weil sie mit verschiedenen Immunzellen interagieren und entzündliche Prozesse modulieren. Sowohl bei Mäusen, als auch beim Menschen werden diese T-Helferzellen unter funktionellen Aspekten basierend auf der Zytokin-Produktion in mindestens drei Gruppen differenziert (Fitch et al., 1993). TH1-Zellen produzieren IL-2, INF- γ , TNF- β und stimulieren vorzugsweise die zellvermittelte Immunabwehr. TH2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und regulieren vorzugsweise die humorale (Antikörper-vermittelte) Immunabwehr. Unter nicht stimulierten Bedingungen sezernieren TH0-Zellen beide, TH1- und TH2-Typ-Zytokine (Fitch et al., 1993). Unter nicht stimulierten Bedingungen produzieren menschliche CD4+-Zell-Klone NGF und den TrkA-Rezeptor (Lambiase et al., 1997). Zudem wird NGF von nicht stimulierten TH1- und TH2-Klonen, aber nicht von TH0-Klonen, nicht nur produziert, sondern auch sezerniert (Lambiase et al., 1997). Die Stimulierung der TH-Zellklone durch Mitogene induziert eine Steigerung der NGF-Sezernierung bei den TH0-Klonen und noch deutlicher bei den TH2-Klonen, während dieser Effekt bei den TH1-Klonen nicht zu verzeichnen ist (Lambiase et al., 1997). Während der T-Zell-Rezeptor-vermittelten Aktivierung durch ein Antigen exprimieren TH1-Zellen den TrkA-Rezeptor (Ehrhard et al., 1994).

NGF und Mastzellen

Den Mastzellen (polymorphkernige basophile Leukozyten) kommen bei der neurogenen Entzündung eine besondere Rolle zu, da sie in unmittelbarer Nähe von afferenten Nervenendigungen und dünnen Blutgefäßen in mukösen und serösen Geweben liegen (Galli et al., 1984; Stead et al., 1987). Aus ihnen freigesetzte Mediatoren, die bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielen, legen nur eine kurze Strecke zwischen neuronalen Strukturen, Mastzellen und Blutgefäßen zurück.

Sie tragen den TrkA-Rezeptor für NGF (Horigome et al., 1993) und werden folglich durch NGF stimuliert (Aloe, 1988; Horigome et al., 1993; Lewin et al., 1994). Die Mastzellen exprimieren und speichern NGF (Leon et al., 1994). Sowohl im Tiermodell als auch in vitro konnte

nachgewiesen werden, dass NGF über die TrkA-Rezeptoren der Mastzellen (Mazurek et al., 1986; Tal und Liberman, 1997) die Degranulierung und nachfolgend die Freisetzung von Serotonin (Horigome et al., 1993) und Prostaglandin E2 (Schmauder-Chock und Chock, 1989), sowie Histamin (Bruni et al., 1982; Horigome et al., 1993) bewirkt. Sowohl Serotonin (in menschlichen Mastzellen allerdings nicht vorhanden!), als auch Prostaglandin E2 können die Nociceptoren sensibilisieren und Schmerz, aber auch Entzündung verursachen (Rueff und Dray, 1993; Schepelmann et al., 1992; Taiwo und Levine, 1990; Taiwo und Levine, 1992). NGF steigert in vitro bei peritonealen Mastzellen der Ratte das Überleben (Horigome et al., 1994). NGF-Applikation bei neugeborenen Ratten steigert sowohl die Größe, als auch die Anzahl von Mastzellen (Aloe und Levi-Montalcini, 1977). Die intrasynoviale Injektion von NGF induziert die erhöhte lokale Verteilung von Mastzellen (Aloe et al., 1992c).

Mastzellen akkumulieren zum Beispiel in der Synovialflüssigkeit bei der Rheumatoiden Arthritis (Aloe et al., 1992c; Malone und Metcalfe, 1988; Mican und Metcalfe, 1990) und in der Haut von Sklerodermie-Patienten (Tuveri et al., 1993). Auch bei der Multiplen Sklerose (ebenso eine autoimmune Erkrankung) sind die Mastzellen vermehrt vorhanden und in Plaques nachgewiesen worden (Olsson, 1974; Toms et al., 1990). In allen diesen Erkrankungen sind auch erhöhte NGF-Konzentrationen gemessen worden. Die während eines entzündlichen Prozesses infiltrierenden Lymphozyten könnten durch ihre NGF-Produktion die erhöhte Menge und Verteilung der Mastzellen bewirken, die wiederum vermehrt Entzündungsmediatoren, aber auch NGF, produzieren. NGF wiederum wirkt auf die B- und T- Lymphozyten mit vermehrter Proliferation und Antikörpersynthese. NGF scheint an dieser Kaskade einen großen Anteil zu haben, so dass eine anti-NGF-Therapie zur Unterbrechung entgleister immunpathologischer Mechanismen sinnvoll erscheint.

Von NGF ist ein chemotaktischer Effekt auf polymorphkernige Leukozyten in vitro (Gee et al., 1983) und in vivo (Boyle et al., 1985) nachgewiesen worden. Dieser Effekt kann direkt sein (Molnar et al., 1997; Molnar et al., 1998), oder auch indirekt über die Mastzellen-Aktivierung und der nachfolgend vermehrten Adhärenz an Blutgefäßwände, vermehrten Emigration und Akkumulation von Leukozyten (Kubes und Granger, 1996).

NGF hat einen dosisabhängigen Einfluss auf das Überleben von eosinophilen (Hamada et al., 1996) und neutrophilen (Kannan et al., 1991) Granulozyten, was bei den letzteren auf die

Supprimierung der Apoptose zurückgeführt wurde (Kannan et al., 1992). NGF wirkt als Kolonie-stimulierender Faktor auf Vorläuferzellen des Knochenmarks beim Menschen (Matsuda et al., 1988) und bei der Maus (Kannan et al., 1993). NGF induziert die Ausschüttung von Mediatoren von basophilen (Bischoff und Dahinden, 1992), eosinophilen (Takafuji et al., 1992) und neutrophilen (Kannan et al., 1991) Granulozyten und fördert zusätzlich die Differenzierung von basophilen Granulozyten (Tsuda et al., 1991).

Die Coexpression von NGF und seinem Rezeptor in denselben Zellpopulationen wie bei Mastzellen, Lymphozyten, T-Helferzellen, lässt einen autokrinen Mechanismus vermuten. Vom anatomischen Gesichtspunkt her, innervieren die adrenergen sympathischen Ganglien, die NGF-sensitiv sind, lymphoide Organe wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark. Die Präsenz von sympathischen Nervenfasern in hoher Dichte in lymphoiden Geweben lässt die Übersetzung neuraler Informationen in immunchemische Prozesse vermuten. Dabei scheint NGF ein wichtiges Verbindungsglied zwischen dem Nerven- und Immunsystem zu sein. Zirkulierendes NGF repräsentiert ein Molekül, das nicht auf ein Organ oder System limitiert ist. Dies lässt auf eine Schlüsselrolle bei der globalen Homöostase des Organismus schließen.

3.12 NGF und das neuroendokrine System

Stressreiche Situationen, die durch die Ausschüttung von Substanzen wie ACTH und Corticosteroiden aus endokrinen Drüsen gekennzeichnet sind, führen zur Überexpression von NGF-mRNA und NGF-Protein (Alleva et al., 1993; Aloe et al., 1986). Zum Beispiel geht aggressives Kampfverhalten erwachsener männlicher Mäuse mit einer erheblichen Ausschüttung von NGF in die Blutbahn einher (Aloe et al., 1986). Dabei ist auch im Hypothalamus vermehrt NGF-mRNA und NGF-Protein nachweisbar (Spillantini et al., 1989). Interessanterweise sind die NGF-Werte bei der sich unterordnenden Maus höher als bei der dominierenden Maus (Maestriperi et al., 1990). Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht nur Aggression, sondern auch Angstzustände, eine massive Ausschüttung von NGF verursachen. Auch beim Menschen sind die NGF-Konzentrationen im Blut durch stressreiche und ängstliche Situationen erhöht (Aloe et al., 1994b): bei Soldaten wurden die NGF-Plasmaspiegel vor und kurz nach ihrem ersten Fallschirmsprung bestimmt und mit einer Kontrollgruppe verglichen, die nicht springen sollte. Die NGF-Werte waren am Abend vor dem Sprung um 84% und 20 Minuten nach dem Sprung

um 107% im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, während die Konzentrationen von IL-1 und TNF-alpha unverändert waren. Auch der p75- und TrkA-Rezeptor auf peripheren, zirkulierenden Lymphozyten waren vermehrt nachweisbar. Interessanterweise waren die Plasmaspiegel von Cortisol und vom Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) vor dem Sprung unverändert und nach dem Sprung deutlich erhöht, was vermuten lässt, dass die ansteigenden NGF-Konzentrationen im Verlauf das Ansteigen der Stresshormone bewirkt.

Bei Menschen, die vermehrte Angstzustände durch den Alkohol- und Heroin-Entzug hatten, waren ebenso erhöhte Plasma- NGF-Spiegel nachgewiesen worden (Aloe et al., 1996).

Hohe zirkulierende Mengen von NGF beeinflussen das Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System über die Ausschüttung von ACTH und Plasma-Glukocorticoide (Otten et al., 1979). NGF ist in der Hypophyse und dem Hypothalamus nachgewiesen worden (Lahtinen et al., 1989; Ojeda et al., 1991) und Hormone der Schilddrüse, sowie der Nebennieren steigern die NGF-Synthese (Aloe, 1989; Dicou et al., 1986). NGF-Plasma-Spiegel sind bei Frauen während der Schwangerschaft und der Stillperiode (eine Phase mit stark erhöhten Oxytocin-Spiegeln) im Vergleich zu Kontrollpersonen erhöht (Luppi et al., 1993). Intravenöse Injektionen von Oxytocin bei weiblichen Ratten erhöhen den Gehalt von NGF im Hypothalamus (Luppi et al., 1993).

3.13 NGF und Zytokine

NGF ist in ein komplexes Netzwerk von Zytokinen eingebunden.

Sowohl Zytokine, als auch NGF sind wichtige regulierende Faktoren bei Immunprozessen. Unter den potenten proinflammatorischen Zytokinen sind unter anderem Interleukin-1-beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) (Arai et al., 1990). Das Zytokin-Netzwerk stellt ein bidirektionales Verbindungsglied zwischen dem Nervensystem und dem Immunsystem dar. Eine Dysbalance in diesem System könnte die Exazerbation pathologischer autoimmuner Prozesse verursachen.

IL-1 β wird u. a. von Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten synthetisiert. Es steigert die Chemotaxis, vergrößert die vaskuläre Permeabilität und die Ausschüttung von Prostaglandinen und Thromboxanen durch Neutrophile, Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten (Hartung et al., 1989).

TNF- α wird überwiegend von Makrophagen, aber auch von T-Lymphozyten, Mikroglia, Astrozyten und Mastzellen synthetisiert (Gordon und Galli, 1990; Hartung et al., 1992; Lieberman et al., 1989; Sawada et al., 1989).

In den Untersuchungen von Gadiant et al. (Gadiant et al., 1990) zeigte sich, dass *in vitro* die Zytokine IL-1 β und TNF- α synergistisch die Ausschüttung von NGF aus Ratten-Astrozyten stimulieren. In anderen Untersuchungen (Hattori et al., 1993) wurde nachgewiesen, dass die NGF-Synthese in nicht neuronalen Zellen durch TNF- α stimuliert wurde (Hattori et al., 1993). 1987 wurde auch schon beschrieben, dass IL-1 β in nicht-neuronalen Zellen des Nervus ischiadicus die Produktion von NGF erhöhte. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis waren in der synovialen Flüssigkeit beide Zytokine und NGF erhöht (Aloe et al., 1999).

Die Korrelation zwischen erhöhten NGF-Werten und den Zytokinen IL-1 β , sowie TNF- α bei Mäusen mit Arthritis wurde von Manni und Aloe (1998) untersucht. Dabei wurde die Arthritis durch intraartikuläre Injektionen ins Kniegelenk mit Carrageenan, IL-1 β und TNF- α erzeugt. Bei der Carrageenan-induzierten Arthritis waren die NGF-Werte im Kniegelenk nach 48h erheblich gesteigert, während die TNF- α Werte schon nach 24h deutlich erhöht waren. Hingegen führte die intraartikuläre Injektion mit IL-1 β zu einem deutlichen Anstieg von NGF schon nach 24h und von TNF- α nach 48h. Bei der Injektion von TNF- α , von dem *in vitro* die Stimulierung der NGF-Synthese (Hattori et al., 1993) und die Beteiligung an arthritischen Prozessen (Brennan et al., 1992) beschrieben worden war, waren nach 24h keine Veränderungen der NGF-Werte und nach 48h sogar erniedrigte Werte gemessen worden. Um weitere Informationen über die Zusammenhänge zwischen TNF- α und NGF bei Arthritis zu erhalten, wurden TNF-Antikörper in die Carrageenan-induzierten arthritischen Kniegelenke injiziert. Die dabei gemachte Beobachtung, dass die TNF-Antikörper die NGF-Konzentrationen erhöht, lässt den Schluss zu, dass TNF- α nicht direkt NGF erhöht. Erst die kombinierte Injektion von IL-1 β und TNF- α ließ die NGF-Werte hochschnellen und zwar deutlich höher als mit der Injektion von IL-1 β alleine. Dies führt zu der Hypothese, dass TNF- α die Wirkung von IL-1 β auf die Erhöhung von NGF verstärkt, sie aber alleine nicht bewirken kann. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse könnte auch in unterschiedlichen Mechanismen bei Nagetieren und Menschen liegen. Es könnte aber auch die Regulierung der NGF-Konzentration von der Dosierung des exogen applizierten TNF- α abhängig sein.

Steiner et al. untersuchten die Zytokin-induzierte Expression von NGF bei mesangialen Zellen der Ratte (Steiner et al., 1991). Von diesen Zellen wird eine pathogenetische Rolle bei der immun-induzierten Glomerulonephritis angenommen (Radeke und Resch, 1992). Die simultane Gabe von IL-1 β und TNF- α verursachte einen erheblichen Anstieg der NGF-Expression bei den kultivierten glomerulären Mesangialzellen, während IL-1 α in Kombination mit TNF- α , sowie jedes einzelne Zytokin alleine, die NGF-Synthese nicht zu steigern vermochte. Der synergistische Effekt von IL-1 β /TNF- α konnte durch Dexamethason verhindert werden, aber nicht durch den Cyclo-oxygenase-Inhibitor Indometacin. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe lassen darauf schließen, dass die Zytokinkaskade einschließlich NGF einen großen Anteil an der Pathophysiologie von entzündlichen renalen Erkrankungen hat.

In einer anderen Untersuchungsreihe (Manni et al., 2003) wurden menschliche synoviale Fibroblasten isoliert und in vitro mit den Zytokinen IL-1 β und TNF- α behandelt. Nach Gabe von IL-1 β in das Kulturmedium wurde sowohl in normalen, als auch in arthrotisch veränderten synovialen Fibroblasten, ein erheblicher Anstieg an NGF gemessen. NGF wurde unter diesem Zytokineinfluss vermehrt von den Fibroblasten ins Kulturmedium abgegeben, aber auch vermehrt produziert, denn die NGF-mRNA stieg erheblich intrazellulär an. Diese Ergebnisse zeigen, dass NGF lokal produziert wird. TNF- α -Gabe ins Medium bewirkte nur in hohen Dosen die vermehrte NGF-Ausschüttung und hatte keinen Einfluss auf die NGF-mRNA-Produktion. Unter pathologischen Bedingungen scheint die erhöhte Zytokinproduktion, die in vielen entzündlichen Gelenkerkrankungen vorzufinden ist (Brennan et al., 1998), dann die vermehrte Expression von NGF zu bewirken.

IL-6 ist ein pleiotropes, immunmodulatorisches Zytokin, dass von einer Vielzahl von Zellen wie Fibroblasten, endotheliale Zellen, Monozyten und Lymphozyten produziert wird (Akira et al., 1993). Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung und Wachstum hämopoetischer Zellen, B- und T-Zellen, Keratinozyten, neuronalen Zellen, Osteoklasten und endothelialen Zellen (Bauer und Herrmann, 1991). Bei Entzündungen induziert IL-6 die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in Hepatozyten (Le und Vilcek, 1989). Es ist in vielen Regionen des Gehirns nachweisbar (Gadient und Otten, 1993; Gadient und Otten, 1994) und scheint die Differenzierung und Erhaltung verschiedener neuraler Subpopulationen zu unterstützen (Hama et al., 1989; Hama et al., 1991; Satoh et al., 1988). IL-6 moduliert die NGF-Synthese in Astrozyten (Frei et al.,

1989). Erhöhte IL-6-Konzentrationen wurden im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Robak et al., 1998) und in der cerebrospinalen Flüssigkeit von Patienten mit Systemischem Lupus erythematoses (Hirohata und Miyamoto, 1990) nachgewiesen; beides Erkrankungen, bei denen auch NGF in erhöhten Konzentrationen gefunden wird.

NGF führt zur Überexpression des IL-2-Rezeptors auf der Oberfläche von menschlichen T- und B-Lymphozyten (Brodie und Gelfand, 1992; Thorpe et al., 1987b).

Viele Untersuchungen lassen vermuten, dass NGF in Entzündungen involviert ist. Andere Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6, und TNF- α werden bei entzündlichen Gewebsverletzungen vermehrt gefunden. Sie können die NGF-Synthese sowohl im peripheren (Lindholm et al., 1987; Steiner et al., 1991), als auch zentralen Nervensystem (Frei et al., 1989; Gadiant et al., 1990; Otten et al., 1990; Spranger et al., 1990) induzieren. Im ZNS produzieren Astrozyten in großen Mengen IL-1. Sowohl NGF, als auch IL-1 akkumulieren bei Gehirnverletzungen. Die vermehrte Induktion der NGF-Produktion könnte in diesem Fall der Regeneration des Nervengewebes dienen. Intrastriatiale und intraventrikuläre Applikationen von IL-1 β bei Ratten erhöht die NGF-Synthese (Otten et al., 1990; Spranger et al., 1990), was IL-1 als einen wichtigen Regulator der NGF-Synthese im Gehirn, zumindest bei Ratten, vermuten lässt.

3.14 NGF und Neuropeptide

Im Spinalganglion afferenter Nervenfasern werden viele Neuropeptide synthetisiert. Sie werden über den axonalen Transport orthodrom zu den Synapsen im Hinterhorn transportiert. Unter pathologischen Umständen, z.B. nach mechanischen, thermischen und chemischen Reizen, werden diese Peptide auch durch Transport zu den Nervenendigungen in der Peripherie transloziert. Andere Substanzen können als Mediatoren von Entzündungen diese Neuropeptidhaltigen Nervenenden stimulieren. Dazu gehören Substanzen wie Histamin, Serotonin, Bradykinin und NO (Maggi, 1991). Die Neuropeptide sind nicht nur in die Neurotransmission und Neuromodulation involviert, sondern beeinflussen in der unmittelbaren Umgebung der sensorischen Nerven die Immunfunktion, den Gefäßtonus und zelluläre Mechanismen. Sie interagieren miteinander in einem komplexen Netzwerk und modulieren das

periphere Nervensystem. Die Koexistenz verschiedener Neuropeptide im selben Nerven und die Vielfalt der möglichen Kombinationen zeigt die Komplexität dieses Netzwerkes.

In den Spinalganglienzellen wurden bisher eine Vielzahl von Neuropeptiden nachgewiesen: Tachykinine, zu denen die Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB) gehören, Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP), Bombesin, Somatostatin (SOM), Cholezystokinin (CCK), Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), Galanin, Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide (PACAP) und Neuropeptide Y (NPY) (Gibson et al., 1984; Holzer, 1992; Moller et al., 1993).

NGF übt einen direkten Einfluss auf eine Vielzahl anderer Neuropeptide aus, da NGF, ähnlich wie in der Embryonalentwicklung, im terminalen Neuron aufgenommen und mittels axoplasmatischen Transport zum Ganglion transportiert wird. Hier kommt es dann zur Überexpression von SP und CGRP (Lindsay RM and Harmer, 1989; Lindsay et al., 1989).

Umgekehrt führt die Antagonisierung von NGF zu einer Reduktion dieser Neuropeptide (Goedert et al., 1984; Otten, 1984).

Aus diesem Grund werden wichtige Vertreter der Neuropeptide im Folgenden kurz dargestellt.

Substanz P (SP)

Substanz P (SP) ist ein Neuropeptid, bestehend aus 11 Aminosäuren und wurde 1931 von v. Euler und Gaddum erstmalig beschrieben. Seit Lembeck (1953) gilt SP als Mediator für die neurogene Entzündung mit Vasodilatation und Plasmaextravasation. Dieses Neuropeptid wird im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert und spielt als Neurotransmitter in der Übertragung von primär afferenten nociceptiven Informationen der nicht-myelinisierten C-Fasern (McNeill et al., 1989) und dünn myelinisierten A δ -Fasern (Lembeck et al., 1981; Lembeck, 1988) eine wichtige Rolle. Es gehört zu der Familie der Tachykinine, zu denen auch Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB) gehören. Für die Tachykininsynthese sind zwei Gene verantwortlich: Preprotachykinin I (kodiert die Synthese von SP und NKA) und Preprotachykinin II (kodiert die Synthese von NKB) (Maggio, 1988). SP, NKA und NKB binden mit verschiedenen Affinitäten an drei verschiedene Neurokinin-Rezeptoren (NK₁, NK₂ und NK₃). SP kann mit allen drei Rezeptoren interagieren, bevorzugt aber den NK₁-Rezeptor (Regoli et al., 1994).

NKA und SP rufen an den postkapillären Venolen die Plasmaextravasation hervor (Holzer, 1992).

SP wirkt proinflammatorisch, unter anderem durch die Stimulation von Synoviozyten, Prostaglandine und Kollagenase zu produzieren (Lotz et al., 1987) und von Lymphozyten, Entzündungsmediatoren wie die Interleukine zu exprimieren (Kimball et al., 1988). In Keratinozyten stimulieren SP und NKA die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen IL-1 α , IL-1 β und IL-8 (McGovern et al., 1995; Song et al., 2000) und in Fibroblasten induziert SP über den NK₁-Rezeptor die Chemotaxis (Kähler et al., 1993). Auch bei der neurogenen Entzündung scheint den Mastzellen eine große Bedeutung zuzukommen, denn SP ist ein potenter Mastzellendegranulator (Matsuda et al., 1989) und induziert die Expression von TNF- α , Histamin, Prostaglandin D₂ und Leukotrien B₄ aus den Mastzellen in der Haut (Furutani et al., 1999). SP aktiviert Makrophagen (Hartung und Toyka, 1983), Monozyten (Lotz et al., 1988), Thrombozyten und Leukozyten (Ohlen et al., 1989) und induziert die vermehrte Bildung von Adhäsionsmolekülen (Quinlan et al., 1999). Die T-Zell-Proliferation und Immunglobulin-Synthese wird in vitro (Payan und Goetzl, 1985; Stanisiz et al., 1986) und in vivo (Scicchitano et al., 1988) durch SP stimuliert, sowie auch die IL-2-Expression von aktivierten, menschlichen T-Zellen (Calvo et al., 1992). Auch die Differenzierung von B-Lymphozyten wird durch SP gefördert (Bost und Pascual, 1992).

Alle diese Wirkungen von SP auf Zellen des Immunsystems und des Gefäß- und Bindegewebes tragen zu pathophysiologischen Mechanismen verschiedener Gelenk- und Bindegewebskrankungen bei.

Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Das erstmals 1983 von Rosenfeld und Mitarbeitern (Rosenfeld et al., 1983) beschriebene CGRP ist ein Peptid aus 37 Aminosäuren, das im neuronalen Gewebe durch eine alternative Transkription der mRNA des Calcitoningens synthetisiert wird (Rosenfeld et al., 1983). CGRP-haltige Nervenfasern sind bei verschiedenen Tierspezies und beim Menschen überwiegend dünnmyelinisierte Afferenzen (Alvarez et al., 1988; Gibson et al., 1984; McNeill et al., 1988). Es ist häufig in den primär sensorischen Nervenfasern mit SP kolokalisiert (Wiesenfeld-Hallin et al., 1984) und ist in hohen Konzentrationen in den sensorischen Nervenenden in Haut (Björklund et al., 1986; Ishida-Yamamoto et al., 1989), Gelenken, Periost (Bjurholm et al., 1988), Meningen (Messlinger et al., 1995) und Blutgefäßen (Jansen et al., 1986; Uddman et al., 1986a) vorhanden. CGRP ist aber auch in den Motorneuronen des Vorderhorns im Rückenmark nachgewiesen worden, wo es nicht mit SP kolokalisiert ist (Arvidsson et al., 1993). Die Rezeptoren von CGRP

werden anhand ihres pharmakologischen Wirkspektrums in zwei Klassen unterteilt: CGRP-1 und CGRP-2 Rezeptor.

Die intrakutane Injektion von CGRP verursacht ein ausgeprägtes Erythem, unabhängig von Histamin und neurogenen Mechanismen (Brain et al., 1986; Piotrowski und Foreman, 1986; Wallengren und Håkanson, 1987). Es beruht auf der direkten vasodilatatorischen Wirkung des Peptides über die Dilatation der Arteriolen (Holzer, 1992). CGRP wirkt im neuronalen Gewebe als direkter Neurotransmitter und außerhalb des Nervensystems als wichtiger Faktor für den lokalen Blutfluss (Mione et al., 1990). Dieses Neuropeptid potenziert den Ödem-bildenden Effekt von IL-1 (Buckley et al., 1991) und fördert die Leukozyten-Adhäsion des Gefäßendothels (Sung et al., 1992). Außerdem stimuliert CGRP die Proliferation von menschlichen Endothelzellen (Hægerstrand et al., 1990) und ist chemotaktisch für menschliche T-Zellen (Foster et al., 1992). Die funktionelle Bedeutung der Kolo-kalisation von SP und CGRP ist noch offen. Teilweise sind synergistische Wirkungen beider Neuropeptide beschrieben (Brain und Williams, 1988), zum Teil scheint aber auch das Gegenteil einzutreten. Die Injektion beider Substanzen in die Haut beim Kaninchen und beim Menschen zeigte, dass SP das CGRP-induzierte Erythem deutlich verminderte (Wiesenfeld-Hallin et al., 1984). CGRP besitzt auch potente antiinflammatorische Eigenschaften wie die Minderung der entzündungsfördernden Aktivität von Serotonin, Histamin und Leukotrien B₄ (Raud et al., 1991). Zum Teil wirkt CGRP antagonistisch für einige Wirkungen von SP. Es reduziert die Proliferation der T-Zellen auf mitogene Stimuli (Teresi et al., 1996) und die Produktion von IL-2 (Wang et al., 1992). CGRP wird auch in menschlichen B-Lymphozyten synthetisiert (Bracci-Laudiero et al., 2002). Dabei ist die Produktion in ruhenden B-Zellen niedriger und steigt mit der Aktivierung der Zellen (Bracci-Laudiero et al., 2002).

Vasoactive intestinal Peptide (VIP) und

Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)

VIP ist ein Peptid mit 28 Aminosäuren und wurde in Nervenfasern von Hautgefäßen, in Schweiß-, apokrinen und Meibomschen Drüsen, sowie in Haarfollikeln und Merckelschen Zellen nachgewiesen. VIP enthaltende Nervenfasern sind auch in der Nähe von Mastzellen nachweisbar (Harvima et al., 1993) und wird auch in cholinergen parasymphatischen Nervenfasern gefunden (Levine et al., 1985). Es vermittelt die Vasodilatation über die Synthese des NO (Williams, 1982) und fördert die Keratinozytenproliferation und Migration (Wollina et al., 1997). VIP induziert die Schweißsekretion (Sato und Sato, 1987) und ist wahrscheinlich ein wichtiger Transmitter bei der

neurogenen Entzündung, weil es die Histaminfreisetzung aus Mastzellen induzieren kann (Warren et al., 1993).

PACAP ist ein Polypeptid, das zu der VIP-Familie gehört. Es sind bisher zwei Formen gefunden worden: PACAP-38 und ein abgespaltenes Produkt, PACAP-27 (Hosoya et al., 1993).

PACAP wurde in Nervenfasern der Haut bei Nagetieren und beim Menschen nachgewiesen, wo es in sensorische, nociceptive und wahrscheinlich autonome Bahnen involviert ist (Dun et al., 1996). Die höchste Immunreaktivität wurde um Blutgefäße, Haarfollikel und Schweißdrüsen gefunden. PACAP verstärkt bei kutanen Entzündungen die Vasodilatation und das Ödem und fördert auch die Plasmaextravasation in der Haut (Cardell et al., 1997; Warren et al., 1992).

Vermehrte Konzentrationen wurden bei psoriatisch veränderter Haut nachgewiesen (Eedy et al., 1991). PACAP verringert in T-Lymphozyten und Makrophagen die Produktion von IL-2 und IL-6 und inhibiert die Expression von IL-10 (Martinez et al., 1998).

Drei verschiedene VIP/PACAP-Rezeptoren (Arimura und Shioda, 1995) konnten geklont werden, zu denen beide Neuropeptide in unterschiedliche Affinitäten haben. Alle drei Rezeptor-Typen konnten beim Menschen in verschiedenen peripheren Organen nachgewiesen werden, ebenso wie in endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und in Keratinozyten (Granoth et al., 2000; Sung et al., 1999). Von PACAP und VIP wurden kürzlich antiinflammatorische Eigenschaften bei der rheumatoiden Arthritis nachgewiesen. Beide Neuropeptide können die Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von TNF- α verhindern (Delgado et al., 1999a; Delgado et al., 1999b).

Somatostatin (SOM)

Das Neuropeptid SOM, zuerst aus dem Rinder-Hypothalamus extrahiert, wurde später im Pankreas und Darm nachgewiesen (Polak und Bloom, 1986). Es ist im ZNS und in sensorischen Fasern des Herzens, des Urogenitaltraktes, Auges, Thymus, Schilddrüse, Haut und Gelenken nachweisbar (Polak und Bloom, 1986). SOM fungiert als Neurotransmitter, wirkt auf die Kontraktilität von glatten Muskelzellen, auf die Drüsensekretion und auf die Zellproliferation. Im Immunsystem hemmt es die Proliferation von menschlichen T-Lymphozyten (Payan et al., 1984). SOM wirkt antagonistisch auf die Substanz P: neben der SP-Freisetzung (Gazelius et al., 1981) hemmt es die Vasodilatation und Extravasation von Monozyten (Szolcsányi et al., 1998). Zudem wird die Expression von Histamin und Leukotrien D₄ aus stimulierten, menschlichen Basophilen gehemmt (Goetzl und Payan, 1984). Allerdings kann SOM die Histaminfreisetzung aus

Mastzellen nicht unterdrücken (Theoharides und Douglas, 1981). Die Ausschüttung von SOM aus dem Hypothalamus wird durch Zytokine reguliert (Scarborough, 1990). SOM hat einen analgetischen Effekt und reduziert zum Beispiel bei Entzündungen durch Uratkristalle (Denko und Gabriel, 1985) und bei experimentell induzierter Arthritis beim Kaninchen die entzündliche Aktivität (Matucci-Cerinic et al., 1988). In vitro wird die Proliferation von Chondrozyten durch SOM stimuliert (Johansson und Madsen, 1987). In vitro können physiologische Konzentrationen von SOM die Proliferation von synovialen Zellen, die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, sowie die Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMP-1, MMP-2 und MMP-9) reduzieren (Tabeka et al., 1997). Bei Patienten mit Psoriasisarthritis (Matucci-Cerinic et al., 1992) und der rheumatoiden Arthritis (Fioravanti et al., 1995; Paran et al., 2001) zeigte die intraartikuläre, intramuskuläre und intravenöse SOM-Applikation sowohl analgetische, als auch antiinflammatorische Wirkung.

Neuropeptid Y (NPY)

NPY ist in sympathischen efferenten Nervenfasern nachweisbar, unter anderem auch in der Synovialmembran (Levine et al., 1985). In noradrenergen Fasern ist NPY mit Norepinephrin kolokalisiert (Madden und Felten, 1995). Die Expression von NPY mRNA wurde in aktivierten B- und T-Lymphozyten nachgewiesen (Schwarz et al., 1994). NPY verursacht eine Vasokonstriktion, reduziert den lokalen Blutfluss im peripheren Gewebe (Niissalo et al., 2002) und wirkt als Inhibitor der Bradykinin-induzierten Plasmaextravasation (Niissalo et al., 2002). Im SLE-Tiermodell wurden sowohl in den Nieren, Thymus und Milz erhöhte Werte für NPY gemessen (Bracci-Laudiero et al., 1998).

NPY scheint in kognitive Funktionen und in Angstzustände involviert zu sein (Cleary et al., 1994) und seine Anwendung hat bei Mäusen zu vermehrtem Gedächtnisvermögen geführt (Flood et al., 1987). Von NPY und CGRP wurde gezeigt, dass sie die experimentell induzierte Beeinträchtigung des Lernverhaltens durch Mk-801 (Dizocilpin, ein nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA Rezeptor Kanal) abschwächen konnten (Bouchard et al., 1997).

Im Rahmen von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sind zum Beispiel im menschlichen Kniegelenk signifikant erhöhte Konzentrationen von SP (Arnalich et al., 1994; Marshall et al., 1990), NKA, CGRP (Arnalich et al., 1994), NPY (Larsson et al., 1989; Larsson et al., 1991) und VIP (Arnalich et al., 1994; Lygren et al., 1986) gefunden worden.

Auch NGF ist bei diesen Erkrankungen erhöht gefunden worden (siehe unten). Einer der Effekte der erhöhten Menge von NGF ist über den retrograden Transport in sensorischen Neuronen die Überexpression von Neuropeptiden wie SP und CGRP auf der Ebene der Gen-Expression (Lindsay und Harmer, 1989; Lindsay et al., 1989). Umgekehrt wurde gezeigt, dass die Entziehung von NGF zu einer Reduktion dieser Neurotransmitter führt (Goedert et al., 1984; Otten, 1984).

In einer Untersuchungsreihe von Aloe et al. (1995) wurden bei für TNF- α transgenen Mäusen, die eine entzündliche Polyarthritis entwickeln, in der Synovia NGF-, Substanz P (SP)- und Histamin (HI) –Konzentrationen sowie auch die Mastzellendichte gemessen. Zusätzlich wurden diese Substanzen hinsichtlich ihrer veränderten Konzentrationen untersucht nach der Gabe von NGF-Antikörpern und von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), welches selektiv die sympathischen peripheren Nervenenden zerstört (Tranzer und Thoenen, 1968). In der arthritischen Synovia waren die Konzentrationen von NGF, HI, SP und die Mastzellendichte erheblich höher als bei „gesunden“ Kontroll-Mäusen. Nach 12 s.c. Injektionen von NGF-Antikörpern über 4 Wochen hinweg, fielen sowohl die Histamin- als auch die Substanz P-Werte auf normale Konzentrationen bezogen auf gesunde Kontrolltiere zurück. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt der NGF-Antikörper über die periphere sympathische Innervation erreicht wird, wurde einigen arthritischen Tieren ausschließlich 6-OHDA injiziert, um selektiv diese sympathische Innervation zu zerstören. Dabei wurden die SP-Konzentrationen nur um 30% reduziert, während die Mastzellen und die Histaminkonzentrationen unbeeinflusst blieben. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Gabe von NGF-Antikörpern die Reduktion der Mastzellen und der HI/SP-Konzentrationen vor Ort ohne die periphere sympathische Innervation beeinflusst hat. Die Substanz P war durch die anti-NGF-Applikation bei den polyarthritischen Tieren auf Normalwerte gesunken, während die pharmakologische Zerstörung der peripheren Nervenenden eine vergleichsweise kleine Reduktion (30%) bewirkte.

Donnerer et al. (1992) haben bei experimentell induzierter Arthritis bei Ratten eine parallele Steigerung der Werte für NGF und SP/CGRP im Ischiasnerv nachgewiesen. Sie induzierten die Arthritis mit Hilfe von Freund's Adjuvans. Eine intraplantare Injektion dieser Emulsion verursachte eine milde lokalisierte unilaterale Arthritis. Während der ersten beiden Wochen blieb die kontralaterale Seite unbeeinflusst und diente zur Kontrolle. Die entzündungsbedingte Neuropeptiderhöhung konnte durch anti-NGF Gabe verhindert werden.

Amann et al. (1996) zeigten, dass unilaterale Injektionen von NGF in die Hinterpfote von Ratten eine erhöhte bilaterale Expression von Prepro-Tachykinin mRNA (eine Vorstufe von SP und Neurokinin A) und Prepro-CGRP mRNA in den dorsalen Wurzelganglien von L5 bewirkte. Bracci-Laudiero et al. (2002) wiesen nach, dass NGF in menschlichen B-Lymphozyten die CGRP Synthese induziert und dass anti-NGF in ruhenden B-Zellen die CGRP Expression reduzierte. Da CGRP auch potente antiinflammatorische Wirkungen hat, könnte eine partielle Wirkung von NGF über die Regulierung der CGRP-Produktion auch in der Herabsetzung immuner Reaktionen liegen.

Verge et al. (1995) haben bei ausgewachsenen Ratten Zusammenhänge zwischen verschiedenen Neuropeptiden und NGF nach Ischiasnervdurchtrennung untersucht. Zwei Wochen nach dem Eingriff waren die Konzentrationen von CGRP, SP, und SOM deutlich gesunken, während die von VIP, CCK, NPY und GAL nun in vielen Neuronen deutlich erhöht waren. Intrathekale Infusionen mit NGF 2 Wochen nach der Ischiasverletzung wirkten der verminderten Konzentration von CGRP und SP entgegen. Die Werte von SOM blieben unbeeinflusst, was daran liegen wird, dass SOM-positive Neurone keinen TrkA-Rezeptor haben. Die NGF-Infusionen reduzierten die Anzahl der geschädigten Neurone, die VIP, CCK, NPY und GAL exprimierten. Demzufolge wird NGF wahrscheinlich unter physiologischen Bedingungen diese letzt genannten Peptide supprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass NGF die Expression der Neuropeptide sehr unterschiedlich beeinflussen kann.

Interessanter Weise konnte aber auch umgekehrt die intraplantare Injektion von SP die Expression von NGF-mRNA in der Haut von Ratten deutlich erhöhen, was mit dem NK₁-Rezeptor Antagonisten SR140333 vollständig verhindert werden konnte (Amann et al., 2000). Welche Zellpopulation aber die Quelle für die durch den NK₁-Rezeptor vermittelte NGF-Erhöhung ist, blieb unklar.

NGF kann auch die Synthese von NPY in menschlichen T-Lymphozyten induzieren (Bracci-Laudiero et al., 1996b).

Jongsma Wallin et al. (Jongsma Wallin et al., 2001) zeigten, dass in dorsalen Wurzelganglien PACAP fast ausschließlich mit dem TrkA-Rezeptor koexprimiert wird und dass exogen intrathekal zugeführtes NGF die PACAP-Expression in kleinen bis mittelgroßen Neuronen erheblich erhöht (Jongsma Wallin et al., 2001). Auch in vitro war bei PC12 Zellen die PACAP-Produktion durch NGF erhöht (Hashimoto et al., 2000; Sakai et al., 2001). In späteren Studien untersuchten Jongsma Wallin et al. (2003) die Zusammenhänge zwischen NGF und PACAP bei

durch Freund's Adjuvans induzierter Arthritis. PACAP ist eines der Neuropeptide, welches bei dieser experimentellen Arthritis vermehrt nachgewiesen werden kann (Zhang et al., 1998). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die durch die Entzündung hervorgerufene PACAP-Erhöhung in TrkA-positiven Neuronen durch anti-NGF-Gabe verhindert werden konnte (Jongsma Wallin et al., 2003).

Zusammenfassend beeinflusst NGF über TrkA-positive Neurone die Neuropeptid-Expression sowohl unter physiologischen, als auch pathologischen Bedingungen.

3.15 Neurogene Entzündung und Schmerzentstehung

3.15.1 Einführung

Bereits 1876 beschrieb Stricker, dass bei durchtrennten Hinterhornwurzeln die Stimulation des distalen Nervenendes eine Erwärmung der Haut bewirkte. Er vermutete, dass die Vasodilatation durch die Stimulation der Efferenzen, die das Rückenmark über die Hinterwurzeln verlassen, verursacht wurde (Stricker, 1876). 1901 bestätigte Bayliss die Beobachtungen von Stricker. Aber er vermutete, dass afferente Neurone und nicht efferente sympathische Nervenfasern diese beobachtete Vasodilatation hervorrufen (Bayliss, 1901). Bayliss führte den Begriff der antidromen Leitung ein, da er mutmaßte, dass die Vasodilatation über afferente Fasern in die entgegengesetzte, also efferente Richtung geleitet werden. Bruce (1910; 1913) und Breslauer (1919) benutzten Senföl als Lokalirritanz und zeigten, dass die Vasodilatation von der intakten Funktion peripherer Nervenafferenzen abhängig ist. Nach Nervendegeneration oder Blockade der Nervenendigungen durch Lokalanästhesie konnte die durch Senföl verursachte Vasodilatation verhindert werden. Bruce (1910; 1913) bezeichnete seine Beobachtungen als Axonreflex, bei dem die Noxe (Senföl) Aktionspotentiale auslöst, die zunächst entlang der Nervenfasern orthodrom geleitet werden, sich an den Verzweigungsstellen von Axonkollateralen aber wieder antidrom ausbreiten. So kann die Erregung eine flächenhafte Ausbreitung annehmen, die dem Innervationsareal des gereizten, peripheren Nerven entspricht. 1927 führte Lewis den Begriff der triple response ein : nach noxischer mechanischer Reizung der Haut durch einen stumpfen Gegenstand war diese triple response (Dreifachantwort) zu beobachten und bestand aus erstens der Rötung an der Reizstelle, zweitens einem Erythem bis weit in die Umgebung ausstrahlend (die so genannte flare response) und drittens einem Ödem, was durch die erhöhte

Gefäßpermeabilität bedingt war. In späteren Studien beschrieb Lewis, dass die flare response mit einer Hyperalgesie des dazu gehörigen Hautareals einhergeht (Lewis, 1936). In neueren Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die Reizung peripherer Nociceptoren Rötungen auch außerhalb des Innervationsareals der gereizten peripheren Nervenfasern auftreten. Dieser Mechanismus erfolgt über die Umschaltung der aus der Peripherie ankommenden Aktionspotentiale auf spinaler Ebene über die Hinterwurzel (deshalb auch als dorsal root reflex bezeichnet). Die Reizweiterleitung erfolgt dann nach der Umschaltung über die eigentlich afferenten Nervenfasern wieder in die Peripherie (Lin et al., 1999; Willis Jr., 1999). Während es sich beim Axonreflex (flare response) um die Ausbreitung innerhalb des Innervationsareals des gereizten peripheren Nerven handelt, überschreitet der dorsal root reflex dieses Innervationsareal. Kardinalsymptome einer Entzündung sind rubor (Erythem bzw. flare response), calor (aus der Vasodilatation resultierende Überwärmung), tumor (die Schwellung durch die erhöhte Gefäßpermeabilität bedingt) und dolor (die Hyperalgesie). Da die triple response infolge noxischer Stimulation nur in Geweben mit intakter Innervation auftritt (Bruce, 1910; Jancsó et al., 1967) und die Entzündungszeichen von neuralen Strukturen ausgehen, wurde diese Reaktion als neurogene Entzündung bezeichnet (Jancsó et al., 1967).

Im Hinblick auf entzündlich veränderte Gewebe (z.B. Haut oder Gelenke) scheint das Nervensystem und die neurogene Entzündung eine entscheidende Rolle zu spielen. Dies zeigt sich an der Beobachtung, dass neuronale Läsionen wie eine Hemiplegie nach hirnischämischen Insult (Kidd et al., 1989; Thompson und Bywaters, 1966), oder nach Poliomyelitis (Glick, 1967) das Verschwinden der Synovitis auf der plegischen Seite verursachte. Auch die symmetrische Anordnung des Gelenkbefalls bei vielen entzündlichen Erkrankungen scheint ein Hinweis dafür zu sein, dass neurogene Mechanismen eine Rolle spielen (Kidd et al., 1989). Psychischer Stress und das ZNS wurden als ein Faktor für die Exazerbation einer rheumatoiden Arthritis beobachtet (Baker, 1982).

3.15.2 Synovialer Reiz und Schmerzentstehung

Am Beispiel eines synovialen Reizzustandes sollen nun die Mechanismen der Schmerzentstehung und der neurogenen Entzündung erörtert werden.

Aloe et al. (1992a) haben die durch RA entzündlich veränderte Synovia des Kniegelenkes eines Patienten histologisch untersucht. Es fand sich eine erhebliche neurale Vernetzung im Laufe der synovialen Veränderungen. In der synovialen Membran bestand eine diffuse Infiltration durch Lymphozyten und Plasmazellen, sowie eine Proliferation der Kapillaren. Immunohistochemisch war NGF vermehrt in lymphozytären Zellen, vor allem perivaskulär darstellbar.

Die synoviale Membran ist reichlich innerviert. Die Konduktion der nociceptiven Informationen hat ihren Ursprung am stimulierten Nociceptor der peripheren afferenten sensorischen Nerven. Darunter sind die Nervtypen A α , A β , A γ , A δ und B-Nerven, die alle myelinisiert und schnell leitend sind und die Nervenfasern Typ C, die nicht myelinisiert sind, einen kleinen Durchmesser haben und langsamer leiten (Review bei Niissalo et al., 2002). Die Typ C/IV Fasern vermitteln Schmerz-, Juck- und Temperatur-Reize, die A δ /III Fasern vermitteln Schmerz und Temperatur und reagieren am empfindlichsten auf Berührungsdruk (Niissalo et al., 2002). Sie können durch verschiedene Entzündungsmediatoren zum Teil direkt depolarisiert werden. Andere Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, IL-1 β , IL-6, IL-8, Adenosin, Serotonin, Prostaglandine, TNF- α und NGF können diese Fasern aber auch indirekt, z.B. über postganglionäre sympathische Nerven für nachfolgende Stimuli sensibilisieren. Normalerweise kommunizieren postganglionäre Neurone nicht mit den peripheren afferenten Neuronen. Aber unter den pathologischen Bedingungen bei einer Entzündung können diese postganglionären Neurone die afferenten Rezeptoren sensibilisieren (Luppi et al., 1993). Ein bedeutsames Verbindungsglied zwischen diesen beiden Nervenfasern ist NGF. Alle direkten und indirekten sensibilisierenden Wirkstoffe erhöhen die intraneuronale cAMP-Konzentration, die eine Rolle bei der Herabsetzung entzündlicher Prozesse spielt (Niissalo et al., 2002). NSARs erhöhen die cAMP, während Gold und Capsaicin selektiv neurotoxisch für die Typ C/IV Fasern sind.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen Neurofilament (ein neuronaler Marker) konnten freie Nervenenden dieser nociceptiven Fasern in der Synovia, in der Gelenkkapsel, den Sehnen und Ligamenta (Biedert et al., 1992; Kennedy et al., 1982; Ralston et al., 1960) zur Darstellung gebracht werden.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Transduktion der Information von den primären Afferenzen zu den zentralen Ebenen der sekundären Neurone in den Ganglien des Rückenmark-Hinterhorns mittels Neurotransmittern übermittelt. In den Nervenenden der peripheren Fasern sind diese Neuropeptide in Vesikeln gelagert, die bei Depolarisation ins Zielgewebe abgegeben werden (Niissalo et al., 2002). Einer der wichtigsten Neurotransmitter dieser afferenten Typ C-

Fasern ist das Neuropeptid Substanz P (SP) (Pernow, 1983). Ein in diesem Zusammenhang ebenso bedeutsames Neuropeptid ist das CGRP, was in vielen dieser afferenten Fasern mit SP kolokalisiert ist (Gibson et al., 1984; Wiesenfeld-Hallin et al., 1984).

Unter pathologischen Bedingungen werden SP und CGRP sowohl orthodrom in den Hinterhornganglien, als auch antidrom an den peripheren Nervenenden ausgeschüttet (Lembeck und Hozer, 1979). Dieser antidrome Mechanismus ist für die Entstehung der neurogenen Entzündung verantwortlich. Im Tierversuch ist es möglich, durch antidrome Stimulation SP aus den afferenten Nervenendigungen in die synoviale Flüssigkeit freizusetzen und dort in den Gelenken eine neurogene Entzündung hervorzurufen (Ferrell und Russell, 1986; Holzer, 1992). Beim Menschen kann man solche Experimente nicht durchführen, aber es wurden in der synovialen Flüssigkeit arthritischer Gelenke erhöhte Werte für SP, CGRP und Histamin nachgewiesen (Anichini et al., 1997; Appelgren et al., 1991; Arnalich et al., 1994; Joyce et al., 1993; Malone et al., 1986; Marabini et al., 1991; Marshall et al., 1990).

Die periphere Freisetzung der Neuropeptide und Induktion der neurogenen Entzündung mit der triple response erfolgt unter pathologischen Bedingungen nur bei noxischer Intensität der Stimuli (Lewis, 1927). In ausreichender Intensität können verschiedene Stimuli diese Neuropeptide freisetzen: physikalische Reize (thermisch, mechanisch und elektrisch), UV-Strahlung und chemische Substanzen. Nicht nur exogene Stimuli und Noxen, sondern auch endogene Mediatoren können diese neuronalen Mechanismen triggern. Zum einen induzieren die aus den Afferenzen freigesetzten Neuropeptide eine Entzündung, zum anderen hat aber die Entzündung wiederum einen Einfluss auf den Peptidgehalt der afferenten Faser. Zum Beispiel wurden erhöhte Mengen an SP und CGRP im Hinterhorn des Rückenmarks, im Spinalganglion und im Nervus ischiadicus arthritischer Ratten gefunden (Kuraishi et al., 1989; Marlier et al., 1991). Dies bedeutet, dass die endogenen Noxen bei entzündlichen Prozessen eine vermehrte Synthese und Ausschüttung der Neuropeptide bewirken, die dann wiederum durch proinflammatorische Wirkungen die Entzündung weiter verstärken und unterhalten.

Zu diesen erheblichen proinflammatorischen Mechanismen von SP gehört die Wirkung auf Mastzellen, Aktivierung von Makrophagen (Koff und Dunegan, 1985) und B-Lymphozyten (Laurenzi et al., 1989), sowie die Förderung der Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten (Granulozyten) durch die Degranulierung von Mastzellen (Matsuda et al., 1989). SP wirkt auf Chondrozyten, Osteoklasten, Osteoblasten, Thrombozyten (Ohlen et al., 1989), Mastzellen

(Devillier et al., 1985) und Synoviozyten (Lotz et al., 1987). In den kultivierten Synoviozyten von RA-Patienten konnte in vitro nachgewiesen werden, dass ihre Proliferation unter Zugabe von SP stieg und dass SP sie zur vermehrten Ausschüttung von Prostaglandin E2 und Kollagenase stimulierte (Lotz et al., 1987). Über die Stimulierung der Synoviozytenproliferation kann SP zur Pannusbildung beisteuern, sowie über die vermehrte Kollagenase- und Prostaglandinbildung zur zunehmenden Zerstörung des intraartikulären Gewebes und zur Unterhaltung der Entzündungskaskade beitragen. Als Antwort auf die Rezeptor-vermittelte Aktivierung durch Neuropeptide werden verschiedene Zellen stimuliert, andere bioaktive Substanzen wie Zytokine, Prostaglandine, zu exprimieren, NO und CO freizusetzen, die ihrerseits wieder auf die Nervenenden wirken können (Niissalo et al., 2002). Substanz P führt zur Vasodilatation, Plasma-Extravasation und zur Leukozytenevasion (Niissalo et al., 2002). Die Hyperämie bei der neurogenen Entzündung wird durch CGRP über die Dilatation von Arteriolen vermittelt. Die Extravasation von Proteinen tritt an den postkapillären Venolen auf und wird überwiegend durch SP und Neurokinin A verursacht (Holzer, 1992). Diese lokalen Mechanismen der neurogenen Entzündung verursachen einen Circulus vitiosus an neuronaler Aktivierung und daraus resultierender Selbsterhaltung bzw. Steigerung der Entzündung. In diesen Mechanismus greift auch NGF ein. Viele der Neuropeptidhaltigen Nervenfasern vom Typ C/IV tragen den NGF-Rezeptor TrkA (Goedert et al., 1981; Verge et al., 1989).

In vielen in vitro und vivo Studien mit Nervenverletzung, induzierter Entzündung oder auch unter physiologischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass NGF in der Lage ist, über diese Rezeptoren die Expression der Neuropeptide SP und CGRP zu erhöhen (Amann et al., 1996; Fitzgerald et al., 1985; Goedert et al., 1981; Lindsay et al., 1989; Lindsay und Harmer, 1989; Wong und Oblinger, 1991). Darüber hinaus kann die Gabe von anti-NGF den Neuropeptidgehalt von SP und CGRP aber auch reduzieren (Aloe et al., 1995; Goedert et al., 1984; Otten, 1984). Bei der Arthritis im Tiermodell und beim Menschen sind in vielen Untersuchungen erhöhte Konzentrationen von NGF und SP, sowie CGRP nachgewiesen worden. Die schon erwähnte Wirkung der Neuropeptide – insbesondere SP – auf die immunkompetenten Zellen in der Peripherie mit Infiltration von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen etc. erhöht wiederum die Konzentrationen von NGF, denn diese Zellen können zusammen mit Mastzellen NGF exprimieren. So scheint sich die neurogene Entzündung selbst zu erhalten. Es ist aber noch nicht klar, ob NGF Grund oder Folge dieser Ereignisse ist. Auf jeden Fall ist NGF ein Teil dieses neurogenen entzündlichen Netzwerkes (Abb.1).

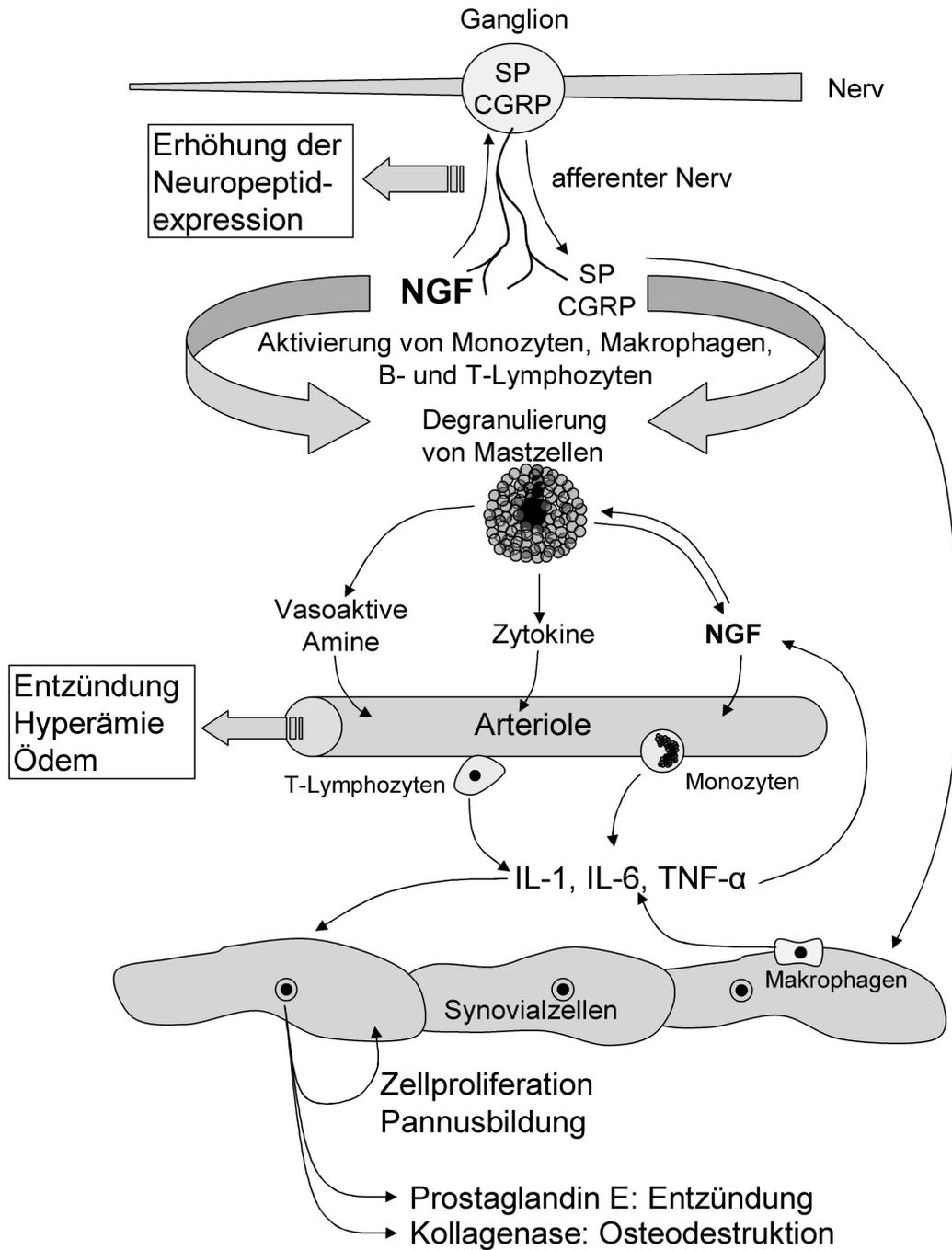


Abb. 1 Mechanismen von NGF und Neuropeptiden bei der neurogenen Entzündung am Beispiel des synovialen Reizzustandes

Über die Bindung an den TrkA-Rezeptor entfaltet NGF seine Wirkung (Ibáñez et al., 1992; Loeb et al., 1991; Loeb und Greene, 1993). Nach der Bindung an den Rezeptor wird rasch eine

Tyrosin-Autophosphorylierung von Trk und nachfolgend anderer Messenger-Proteine induziert (Jing et al., 1992; Kaplan et al., 1991b; Klein et al., 1991a). Die Signalweiterleitung unterliegt wahrscheinlich zwei Mechanismen:

1. Zum einen aktiviert NGF an den terminalen Nervenenden den TrkA-Rezeptor, wird durch eine Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert und wird dann als Vesikel mit dem Rezeptor in seiner Membran und NGF in seinem Lumen retrograd zu den Zellkörpern transportiert, wo die Trk-Phosphorylierung weiterer Proteine im Zellkern die Gen-Expression verändert. Sowohl der retrograde Transport von NGF (Hendry et al., 1974a; Korsching und Thoenen, 1983; Stöckel et al., 1975), als auch der von Trk (Ehlers et al., 1995; Grimes et al., 1996) ist nachgewiesen worden.
2. Senger und Campenot (1997) haben in unterteilten Kulturen bei sympathischen Ratten-Neuronen gezeigt, dass ein Teil der Signalweiterleitung im Nerven auch ohne retrograden Transport des NGF selbst stattfinden muss. Denn die Applikation von NGF nur am distalen Ende der Axone induzierte das Erscheinen von phosphoryliertem Trk in den Zellkörpern/ proximalen Axon (zentrale Abteilung der Kultur) innerhalb von 1 Minute. Die retrograde Phosphorylierung anderer Proteine war innerhalb von 5-15 Minuten nachweisbar, wohingegen der retrograde Transport von ¹²⁵I-NGF nicht vor 30-60 Minuten nachweisbar war. Außerdem wurden auch retrograde Tyrosin-Phosphorylierungen beobachtet, wenn in der zentralen Abteilung mit dem Zellkörper und proximalen Neuriten NGF-Antikörper appliziert wurden, um jede direkte Aktion von NGF zu blocken.

NGF entfaltet über diese beschriebenen Mechanismen seine Wirkung auf die sympathischen und sensorischen Nerven, von denen letztere auch durch NGF vermehrt die Neuropeptide ausschütten.

Die bisher beschriebenen Vorgänge finden auf der Ebene der primären Afferenzen (PNS) und im peripheren Gewebe statt. Die zweite Ebene ist die sekundäre Nociception auf der Ebene des Rückenmarks mit Weiterleitung von Impulsen zu höheren Bereichen des ZNS mit der Folge der so genannten zentralen Sensibilisierung mit Chronifizierung der Schmerzen, Hyperalgesie und Allodynie.

Bei der Hyperalgesie handelt es sich per definitionem um eine gesteigerte Schmerzempfindlichkeit auf einen schmerzhaften Reiz, während bei der Allodynie bei normalerweise nicht schmerzhaften Stimuli Schmerz empfunden wird.

Ein Hauptcharakteristikum von Entzündung ist Schmerz und Hypersensibilität.

Entzündungsschmerz ist ein multifaktorielles Syndrom, das drei große Säulen umfasst:

1. Spontanschmerz, lokal durch die Entzündungsmediatoren, die die Schwelle der Nociceptoren herabsetzen und zur peripheren Sensibilisierung führen (Treede et al., 1992)
2. Vergrößerung der neuralen Antwort auf die anhaltende Stimulierung durch Entzündungs-Noxen durch Förderung von Synapsenbildung im Rückenmark
3. zentrale Sensibilisierung, bei der dann normalerweise harmlose Stimuli schon Schmerz verursachen, was zur Hyperalgesie/ Allodynie führt (Woolf, 1983).

Ein wichtiger Faktor für die Entstehung der Hyperalgesie während einer Entzündung, aber auch für die Entzündung selbst ist NGF. So kann eine einmalige systemische Gabe von NGF eine mechanische und thermische Hyperalgesie bei Labortieren (Lewin et al., 1993; Lewin et al., 1994) und beim Menschen (Petty et al., 1994) auslösen. Eine Hyperalgesie ist aber nicht nur bei exogener Zufuhr von NGF zu beobachten. NGF scheint auch als endogener Mediator von Hyperalgesien bei entzündlich veränderten Geweben eine wichtige Rolle zu spielen. Wird bei Ratten durch die Injektion von kompletten Freund's Adjuvans eine Entzündung der Hinterextremität erzeugt, entsteht eine thermische und mechanische Hyperalgesie. In diesem betroffenen, entzündlich veränderten Gewebe ist ein signifikanter Anstieg von NGF-Konzentrationen nachweisbar (Donnerer et al., 1992; Woolf et al., 1994). Wenn durch Gabe von anti-NGF dieser Anstieg verhindert wird, entsteht während der Entzündung keine Hyperalgesie (Lewin et al., 1994; Woolf et al., 1994). Daraus lässt sich folgern, dass der Anstieg von NGF im entzündlich veränderten Gewebe für die Entzündungshyperalgesie verantwortlich ist. Auch bei der durch Trauma entstehenden Hyperalgesie scheint NGF eine Schlüsselrolle zu spielen.

Bei einer Studie an Ratten wurde durch Ligatur des Nervus ischiadicus am Hinterbein Hyperalgesie erzeugt (Theodosiou et al., 1999). Die subcutane Injektion von anti-NGF konnte bei diesen Tieren eine Linderung der Hyperalgesie auf mechanische und thermische Reize erzielen. Und umgekehrt konnte eine subcutane Injektion von NGF eine Hyperalgesie auf mechanische und thermische Reize auslösen (Theodosiou et al., 1999).

Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang von NGF und der Entstehung von Hyperalgesien konnte durch Experimente mit transgenen Mäusen gewonnen werden. Transgene Mäuse mit einer Überexpression von NGF in der Haut zeigen eine erhebliche mechanische Hyperalgesie und

umgekehrt sind transgene Mäuse mit einer reduzierten kutanen NGF-Expression hypoalgetisch (Davis et al., 1993). Interessant war auch die Feststellung, dass bei den transgenen Mäusen mit einer Überexpression von NGF eine vermehrte Aussprossung von sympathischen postganglionären Fasern zu den Zellkörpern der sensorischen Neurone stattfand (Davis et al., 1994).

Nach einer Injektion von NGF folgt die thermische Hyperalgesie sehr rasch (nach ca. 10 Min). Diese kurze Zeitspanne lässt vermuten, dass dabei keine zentralen, sondern periphere Mechanismen eine Rolle spielen (Lewin und Mendell, 1993). Allerdings hält dann die Hyperalgesie auf thermische Reize bis zu 4 Tage lang an. Da aber das injizierte NGF in einigen Stunden eliminiert sein dürfte (die Halbwertszeit von s.c. injiziertem NGF beträgt 4.5h (Tria et al., 1994)) und die Injektion zu keinen lokalen Gewebsveränderungen wie Erythem oder Ödem führt, ist die spätere Phase der lang anhaltenden Hyperalgesie auf zentrale Mechanismen zurückzuführen (Lewin et al., 1994). In verschiedenen Versuchen an Ratten haben Lewin et al. (1994) weitere Erkenntnisse über die peripheren und zentralen Mechanismen der NGF-induzierten Hyperalgesie gewonnen. Die Autoren vermuten, dass die frühe Phase der thermischen Hyperalgesie (<7 h nach NGF-Injektion) mit peripheren Mechanismen und der Involvierung von Mastzellen zusammenhängt. Mastzellen tragen den TrkA-Rezeptor (Horigome et al., 1993) und NGF bewirkt ihre Degranulierung (Bruni et al., 1982; Mazurek et al., 1986). Wenn diese Mastzellen vor der Gabe von NGF mit der Lösung 48/80 (einem potenten Mastzelldegranulator) chronisch entleert wurden, war in den ersten 3 h nach NGF-Gabe keine Hyperalgesie erkennbar. Erst später entwickelten diese Tiere eine thermische Hyperalgesie. Die Mastzellen der Ratte setzen bei Degranulierung Histamin und Serotonin (5-HT) frei. Von 5-HT ist bekannt, dass es die primären Afferenzen direkt aktivieren und sensibilisieren kann (Beck und Handwerker, 1974; Lang et al., 1990; Rueff und Dray, 1992) und Hyperalgesien bei Nagetieren (Taiwo und Levine, 1992) und beim Menschen (Richardson et al., 1985) auslösen kann. Für die Hypothese, dass NGF peripher via Mastzellen und ihre Mediatoren wirkt, sprechen die Versuchsreihen mit s.c. Injektionen der Serotoninantagonisten Methiothepin (ein selektiver 5-HT₁- und 5-HT₂-Rezeptor Antagonist) und ICS-205-930 (ein selektiver 5-HT₃- und 5-HT₄- Rezeptor Antagonist) (Lewin et al., 1994). Bei der Verabreichung der Antagonisten alleine waren keine Verhaltensänderungen der Tiere auf thermische Reize erkennbar. Erst nach der Injektion von NGF war bei den Tieren mit den 5-HT-Antagonisten nicht nur das Fehlen der Hyperalgesie, sondern sogar eine Hypoalgesie vorhanden.

Die NGF-induzierte thermische Hyperalgesie ist zunächst abhängig von den beschriebenen peripheren Ereignissen am Nociceptor. In späteren Phasen scheinen die zentralen NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) involviert zu sein (Lewin et al., 1994). Es ist gezeigt worden, dass die thermische Hyperalgesie bei Entzündungen und Nervenschädigungen durch die Blockade dieser NMDA-Rezeptoren verhindert werden konnte (McMahon et al., 1993). Bei der intrathekalen Gabe eines systemisch wirkenden NMDA-Rezeptorantagonisten (MK-801) vor der Applikation von NGF (Lewin et al., 1994) war die thermische Hyperalgesie nur 3 h lang vorhanden und danach vollständig aufgehoben. Die ersten 3 h sprechen für den oben beschriebenen peripheren Mechanismus und die Blockade in der späteren Phase für den zentralen Anteil via NMDA-Rezeptoren.

NGF steigert die NMDA-Rezeptoren-Aktivität in Ganglion-Neuronen, was vermutlich mit der Phosphorylierung der NMDA-Rezeptoren zusammenhängt (Di Luca et al., 2001; Jarvis et al., 1997). Dies könnte dann eine höhere Amplitude und prolongierte synaptische Antwort im Rückenmark fördern und über die Fähigkeit von NGF, die vermehrte Ausschüttung und Transport der Neuropeptide zu bewirken (Donnerer et al., 1992; Goedert et al., 1984), somit den Prozess der neurogenen Entzündung weiter unterhalten (Coderre et al., 1991; Green et al., 1993; Levine et al., 1985).

NGF ist zudem ein wichtiges Verbindungsglied zwischen den primären sensorischen Neuronen und den postganglionären sympathischen Neuronen, die ebenfalls den TrkA-Rezeptor exprimieren (Smeyne et al., 1994). Normalerweise sind das sympathische und das somatosensorische Nervensystem unter physiologischen Bedingungen voneinander getrennt. Erst pathophysiologische Verhältnisse wie Entzündung oder Nervenläsion bewirken eine Kopplung beider Systeme. Woolf et al. (1996) zeigten, dass die intraplantare Injektion von NGF bei Ratten sowohl eine thermische, als auch mechanische Hyperalgesie verursachte, die durch chemische Sympathektomie erheblich reduziert werden konnte. Diese Beobachtung wurde als Indiz dafür betrachtet, dass NGF indirekt über eine Wirkung auf postganglionäre sympathische Neurone eine Sensibilisierung peripherer Nociceptoren auslöst.

Die Sensibilitätsveränderungen werden von NGF am Ort des Entzündungsgeschehens (also peripher) und über die Bindung von NGF an die TrkA-Rezeptoren der peripheren Enden der primären, afferenten sensorischen Neuronen (Typ C/IV) (Averill et al., 1995; McMahon et al., 1994; Smeyne et al., 1994) und den retrograden Transport zum Hinterhornganglion des Rückenmarks bewirkt. Dort kommt es zur vermehrten Ausschüttung der Neuropeptide,

Wachstumsfaktoren und Beeinflussung der Ionenkanäle (Donnerer et al., 1992; Leslie et al., 1995; Lindsay und Harmer, 1989). Die Exzessive Erregungsweiterleitung der primären Afferenzen zu sekundären Hinterhorn-Neuronen erzeugt lang anhaltende molekulare Modifikationen, die auch anhaltende Expression von Proto-Oncogenen wie c-fos und c-jun (Abbadie und Besson, 1992; Coderre et al., 1993) beinhalten. Die Protein-Produkte dieser Proto-Oncogene agieren dann wiederum als dritte Messenger, die die Schmerzweiterleitung in höhere Ebenen des ZNS wie Thalamus und somatosensorische Bereiche des Cortex (Coderre et al., 1993) sicherstellen. Die gesamte Dynamik wird als neuronale Plastizität verstanden. Chronischer Schmerz führt demnach zu einer dauerhaften Alteration der neuronalen Expression im zentralnervösen Zielorgan.

Das Tiermodell lässt sich allerdings nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen, denn beim Menschen enthalten die Mastzellen kein Serotonin (Theodosiou et al., 1999)!

Auch beim Menschen kann die Applikation von NGF eine Hyperalgesie auslösen.

Petty et al. (1994) haben in einer doppel-blind und Placebo-kontrollierten Studie gesunden Probanden s.c. und intravenös rhNGF in einer Dosierung von 0.03 bis 1 microgramm/kg verabreicht. Dabei traten Dosis-abhängige Myalgien auf, die meist in der Nacken-,Bulbär- und Kiefermuskulatur begann und später auch in Rumpf-, sowie Extremitäten-Muskulatur auftraten. Die Myalgien waren nicht von einer CK-Erhöhung im Serum begleitet. Die Probanden mit s.c. Injektionen entwickelten ähnlich den Tierversuchen Hyperalgesien auf thermische und mechanische Reize auf der Seite des Einstiches, die bis zu 7 Wochen anhielten.

Interessanterweise waren die weiblichen Probanden für die Entstehung der Myalgien empfänglicher. In verschiedenen Studien sind Zusammenhänge zwischen NGF, weiblichen Hormonen und Nociception gefunden worden (Bjorling und Wang, 2001; Liuzzi et al., 1999; Tsen et al., 2001). Der NGF-Gehalt in den Ganglion-Neuronen scheint auch durch Östrogene reguliert zu werden (Sohrabji et al., 1994).

Dyck et al. (1997) haben bei Probanden 1 oder 3 microgramm NGF intradermal in den Unterarm injiziert. Die Untersuchten gaben eine Schmerzempfindlichkeit auf Druck teilweise schon nach 3 Stunden an, die bis zu 3 Wochen anhielt. Die Schmerzschwelle für thermische Reize war signifikant reduziert. In einigen Fällen war dies schon nach 3 Stunden zu beobachten und hielt ebenso bis zu 3 Wochen an. Diese kurze Zeitspanne von 3 Stunden reicht nicht für die Aufnahme des NGF durch die Nervenenden, seinen retrograden Transport und Regulierung der

Schmerzmodulatoren. Es müssen also auch beim Menschen zunächst periphere, im Gewebe lokalisierte Mechanismen für die Schmerzentstehung verantwortlich sein und erst im weiteren Verlauf die zentralen Prozesse aktivieren.

Svensson et al. haben 2003 bei Probanden 5 Mikrogramm NGF in den Masseter-Muskel injiziert und dabei eine mechanische Hyperalgesie, die sich in einer reduzierten Schmerzschwelle für Druck-Stimuli äußerte, für die Dauer von 7 Tagen und in 75% der Fälle für 2 Wochen gefunden (Svensson et al., 2003).

Bei dem Therapieversuch mit intraventrikulären NGF-Infusionen bei 3 Alzheimer-Patienten (Eriksson Jönhagen et al., 1998) traten Nebenwirkungen mit Schmerzen vor allem des Rückens auf. Die Schmerzen waren einige Tage nach Beginn der Infusion vorhanden, verschwanden innerhalb weniger Tage nach Abbruch der Infusion und traten erneut rasch bei Wiederbeginn der Infusion auf. Bei allen drei Patienten waren die Schmerzen in den Muskeln und dem Bindegewebe lokalisiert, aber eine erhöhte Empfindlichkeit auf Druck wurde nicht berichtet. Die Schmerzentstehung dieser Patienten wurde wahrscheinlich durch zentrale und periphere Mechanismen verursacht. Die Gabe von Dextropropoxyphen (ein zentral wirksames Analgetikum und chemisch nahe verwandt zu Levomethadon) konnte die Schmerzzustände bessern, während die peripher wirksamen Cyclooxygenase-Inhibitoren ASS, Diclofenac und Paracetamol weniger wirksam waren. Die myalgischen Schmerzen waren denen bei der i.v. Injektion bei Petty et al. ähnlich. Allerdings traten sie mit deutlich längerer Latenz auf, wahrscheinlich deshalb, weil der Transport in der cerebrospinalen Flüssigkeit vom Ventrikel bis zum subarachnoidalen Raum im Rückenmark 3-6 h benötigt (Greitz und Hannerz, 1996). Da es keinen direkten Zugang vom subarachnoidalen Raum zu den dorsalen Wurzelganglien gibt, wird der Transport von NGF bis zum epineuralen Gewebe bis zum Erreichen der Ganglien der dorsalen Wurzeln entsprechend viel Zeit benötigen. Dies wird wahrscheinlich die Erklärung für die deutlich längere Latenz im Vergleich zu der intravenösen Gabe (Latenz 60-90 Min) von NGF sein.

An der Beteiligung von NGF an peripherer und zentraler Schmerzentstehung, sowie an der Hyperalgesie besteht kein Zweifel.

4 NGF bei entzündlich-rheumatischen und degenerativen Erkrankungen

Im Folgenden werden verschiedene rheumatische und degenerative Erkrankungen im Hinblick auf NGF-Konzentrationen sowohl beim Menschen, als auch beim Tier, zusammengestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von rheumatischen Erkrankungen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Dort finden sich die NGF-Konzentrationen, die in verschiedenen Körperflüssigkeiten gefunden wurden.

4.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Die rheumatoide Arthritis ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, deren Ursprung nicht bekannt ist. Mögliche Auslöser können antigen-spezifische und nicht-antigen spezifische Mechanismen sein. Aktivierte T-Zellen, die HLA-DR4 exprimieren sind als Initiatoren des pathophysiologischen Prozesses diskutiert worden (Fox, 1997). Aber auch B-Zellen sind durch die herausragenden Erfolge von anti-B-Zell-Therapien (Rituximab) erneut zur Diskussion gestellt worden. Eine Vielzahl immunpathologischer Prozesse sind in die Entzündungskaskade involviert. Die RA ist gekennzeichnet durch synoviale Hyperplasie und Hypertrophie sowie Zellinfiltrationen einschließlich Mastzellen (Fitzgerald, 1989; Malone et al., 1987; Zvaifler, 1996). Monozyten und Makrophagen spielen in allen Stadien der Entzündung der Synovialmembran eine wichtige Rolle (Burmester et al., 1997). Die Makrophagen und Fibroblasten im Gelenk sind eine wichtige Quelle für Zytokine wie TNF- α und IL-1. Aber auch die von T-Zellen produzierten Zytokine sind vorhanden (Klimiuk et al., 1997). Unter diesen Zytokinen spielen TNF- α und IL-1 bei der Gewebsdestruktion im Gelenk eine Schlüsselrolle. Sie induzieren die Synthese von gewebszerstörenden Metalloproteinasen wie Kollagenase und Stromelysin in aktivierten Fibroblasten der Synovialmembran und in Chondrozyten des angrenzenden Knorpels. Auch die Makrophagen sind eine wichtige Quelle dieser zerstörenden Enzyme. Die Fibroblasten-ähnlichen Synoviozyten sind auch an der Synovitis bei der RA beteiligt (Firestein, 1996). Makrophagenprodukte wie die Zytokine aktivieren die Fibroblastenproliferation, die wiederum Zytokine und ebenso Metalloproteinasen produzieren. So entsteht ein komplexes Netzwerk, was zur Bildung des enzymproduzierenden, adhäsiven und

erosiven Pannus führt. Diese chronische Entzündung ist gekennzeichnet durch eine erhebliche Neovaskularisation. Angiogenese-Faktoren (z.B. FGF, EGF, IGF und TGF- β) werden vor allem von Makrophagen sezerniert und induzieren die Bildung neuer Blutgefäße (Koch, 1998).

In verschiedenen Untersuchungsreihen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass auch SP und Mastzellen (mit ihren exprimierten Substanzen wie zum Beispiel Histamin) in die Initiierung und Progression der Arthritis beim Menschen und bei experimentell induzierter Arthritis im Tiermodell involviert sind (Levine et al., 1984; Mican und Metcalfe, 1990).

Die kurz skizzierten Mechanismen führen bei der rheumatoiden Arthritis vom gesunden Gleichgewicht im Gelenk zur reaktiven Synovitis mit einem aggressiven, gewebezerstörenden, chronisch unterhaltenem Prozess.

In diesen Prozess ist auch NGF involviert.

Das NGF/TrkA System fördert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (Ehrhard et al., 1993a) und steigert die Proliferation der T-Zellen, sowie die Antikörpersynthese durch Plasmazellen (Manning et al., 1985; Otten et al., 1989; Thorpe und Perez-Polo, 1987). In vitro wurde nachgewiesen, dass stimulierte TH-Zellklone eine Steigerung der NGF-Sezernierung bei TH0- und TH2-Zellen induzierten (Lambiase et al., 1997). Zudem wirkt NGF chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten (Gee et al., 1983) und erhöht die Gefäßpermeabilität im Tiermodell (Otten et al., 1984). Intrasyoviale Injektionen von NGF bei Ratten erhöhen die Mastzellendichte und Verteilung in der Synovia (Aloe et al., 1992c), während die Gabe von anti-NGF bei Mastzellen zytologische Veränderungen hervorruft und ihre Anzahl vermindert (Aloe et al., 1994a). Sowohl im hyalinen Kniegelenkknorpel, als auch im fibrösen Meniskusknorpel wurden NGF mRNA, NGF-Protein und beide Rezeptoren (p75 und TrkA) nachgewiesen (Gigante et al., 2003). Im arthrotisch veränderten Gelenk sezernieren menschliche Chondrozyten NGF und seinen TrkA-Rezeptor (Iannone et al., 2002). Auch bei der Angiogenese spielt NGF eine wichtige Rolle (Cantarella et al., 2002; Emanuelli et al., 2002; Turrini et al., 2002).

Erhöhte NGF-Konzentrationen werden bei vielen entzündlich-rheumatischen/autoimmunen Erkrankungen gefunden (siehe unten). Da NGF die Proliferation und Degranulierung von Mastzellen fördert (Aloe und Levi-Montalcini, 1977; Bruni et al., 1982), die Synthese und Ausschüttung von SP erhöht (Donnerer et al., 1992) und zudem auch auf eine Vielzahl anderer Zellen des Immunsystems Einfluss hat, ist es denkbar, dass NGF -ähnlich den

proinflammatorischen Zytokinen- einen proinflammatorischen Anteil an der entgleisten Entzündungskaskade hat.

In der Untersuchungsreihe von Aloe et al. (1992a) wurde die synoviale Flüssigkeit von **8** Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht mit dem Ergebnis deutlich erhöhter NGF-Spiegel, während bei gesunden Kontrollpatienten NGF nicht nachweisbar war. Bei der Gonarthrose war der NGF-Gehalt deutlich niedriger als bei den RA-Patienten. Auch wurde in derselben Studie histochemisch die Synovia bei einem dieser Patienten mit polyklonalen oder auch monoklonalen NGF- Antikörpern inkubiert und mit Immunoperoxidase angefärbt: histopathologisch zeigten sich entzündliche Veränderungen wie diffuse Infiltrationen mit Lymphozyten, Plasmazellen und Proliferation der Kapillaren. Immunohistochemisch konnte NGF vermehrt in Lymphozyten-ähnlichen Zellen vereinzelt und in kleinen Gruppen überwiegend perivaskulär nachgewiesen werden. Mit der gleichen Methodik wurde auch die Synovia einer asymptomatischen Gonarthrose untersucht, bei der aber weder entzündliche Infiltrate, noch NGF-positive Zellen nachweisbar waren. Bei beiden Erkrankungen kommt es zur Zerstörung im Gelenk. Aber bei der RA überwiegen entzündliche Prozesse, bei der Arthrose degenerative Prozesse. Die Tatsache, dass NGF in der entzündlichen Synovia der RA nachweisbar war und in der Synovia bei der degenerativen Gonarthrose nicht, impliziert einen direkten Zusammenhang zwischen NGF-Konzentrationen und der Entzündung des Gewebes.

Aloe et al. (1999) haben in einer erweiterten Studie bei **22** Patienten mit Rheumatoider Arthritis die synoviale Flüssigkeit mit der von **8** Patienten mit Arthrose verglichen. Untersucht wurden die NGF-, die TNF- α - und die IL-1 β -Konzentrationen. Dabei waren sowohl NGF, als auch TNF- α und IL-1 β bei den RA-Patienten im Vergleich zu den Arthrose-Patienten deutlich erhöht. Diese Ergebnisse stimmen mit der Erkenntnis überein, dass die Zytokine TNF- α und IL-1 β in vitro die NGF-Synthese fördern (Gadient et al., 1990).

Dicou et al. (1993b) untersuchten bei Patienten mit RA, Systemischem Lupus erythematodes und Thyroiditis die NGF-Konzentrationen im Serum. An der Studie nahmen **24** Patienten mit RA teil. Zur Messung der NGF-Konzentrationen kam der two-site ELISA zum Einsatz. Die Werte in allen Patientengruppen hatten eine enorme Spannweite. Zwischen den Mittelwerten der drei Krankheitsgruppen und der Kontrollgruppe (n=108) war weder mit dem Student's test, noch mit

der ANOVA Analyse ein signifikanter Unterschied unter den Gruppen zu verzeichnen. Aber mit dem χ^2 Test war eine deutlich höhere Frequenz des nachweisbaren NGF in den Gruppen mit RA und mit SLE zu erkennen. Die Frequenz des NGF-Nachweises betrug bei der RA 51.16%, bei dem SLE 37.03%, während bei der Thyreoiditis deutlich niedrigere Werte (17.39%) bestanden. Bei der Kontrollgruppe von 108 Probanden war nur in 11 Fällen NGF im Serum nachweisbar. Die Autoren vermuten, dass andere Proteine, wie z. B. das α_2 Makroglobulin oder NGF-Autoantikörper, NGF im Serum binden und dadurch zu niedrige NGF-Konzentrationen gemessen werden.

In einer weiteren Studie (Halliday et al., 1998) waren ebenso in der synovialen Flüssigkeit (Kniegelenkspunktat) von **13** Patienten mit nachgewiesener Rheumafaktor-positiven Rheumatoiden Arthritis erheblich höhere NGF-Werte mittels two-site ELISA nachgewiesen worden. Dabei wurden die NGF-Konzentrationen mit einer Gruppe von Gesunden (n=5) und einer Gruppe mit anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen (n=12) verglichen. Bei den Gesunden betrug der Mittelwert für NGF 95 ± 33.2 pg/ml, bei der RA-Gruppe 523.5 ± 123.8 pg/ml und bei der Gruppe mit anderen entzündlichen Gelenkerkrankungen 430.0 ± 90 pg/ml. Zu der letzten Gruppe gehörten drei Patienten mit Chondrokalzinose, zwei mit Morbus Reiter, ein Patient mit Sklerodermie, einer mit Spondylitis ankylosans, drei mit HLA B27 assoziierter Arthritis und zwei mit infektiöser Arthritis. Diese Gruppe unterschied sich bezüglich der NGF-Konzentrationen in der synovialen Flüssigkeit nicht wesentlich von der RA-Gruppe. Leider ist in der Studie keine Subgruppenanalyse aufgeführt. Es wäre interessant, die Höhe der NGF-Werte für jede dieser unterschiedlichen Erkrankungen einzeln zu erfahren.

Pozza et al. (2000) haben in einer großen Studie bei **15** Patienten mit RA die Synovia histochemisch und immunohistochemisch auf den NGF-Rezeptor TrkA und auf Isoformen der Stickstoffoxyd (NO) produzierenden NO-Synthase untersucht und mit der Synovia von Probanden mit posttraumatischen, aber nicht entzündeten Gelenken verglichen. NO wird von der NO-Synthase (NOS) vom Precursor L-Arginine synthetisiert. Es gibt drei Isoformen, von denen die induzierbare Form (iNOS) nur nach ausreichend starker Stimulierung, wie zum Beispiel durch Zytokine exprimiert wird (Michel und Feron, 1997). iNOS wird unter anderem in Makrophagen exprimiert und verursacht eine lang anhaltende Produktion von NO. NO wirkt auf eisenhaltige Proteine, einige Aminosäuren, Peptide und auf Proteine, die in Hämoglobin-

Mechanismen, Mutagenese und zytotoxische Mechanismen involviert sind (Stichtenoth und Frölich, 1998). Verschiedene Untersuchungsergebnisse lassen auf eine enge Beziehung zwischen NO, NGF, Entzündung und Immunprozesse, insbesondere bei Gelenkentzündungen und Rheumatoider Arthritis schließen (Aloe und Tuveri, 1997; Moilanen und Vapaatalo, 1995). Es wird vermutet, dass die erhöhte NO-Produktion im Serum und in der Synovialflüssigkeit bei RA-Patienten eine wichtige Rolle bei der Schwere der Gelenkdestruktion spielt (Grabowski et al., 1996; Ueki et al., 1996). In vitro Studien zeigten, dass NO von Synoviozyten, Chondrozyten und Osteoblasten aus menschlichen Gelenken synthetisiert wird, nachdem sie mit proinflammatorischen Zytokinen stimuliert wurden (Laskin et al., 1994; Miyasaka und Hirata, 1997; Stefanovic-Racic et al., 1994). In verschiedenen in vitro Untersuchungen wurde gezeigt, dass NGF die NOS-Expression reguliert. Zum Beispiel steigert NGF in PC12 Zellen (Peunova und Enikolopov, 1995; Poluha et al., 1997) und in Beta-Zellen des Pankreas (Fayad et al., 1997) die NOS-Expression. In der Studie von Pozza et al. wurde in der rheumatoiden Synovia eine deutlich höhere Menge an NO im gesamten Pannus, einschließlich der hypertrophierten Mukosa, im Bindegewebe und in den Blutgefäßen nachgewiesen. Der immunohistochemische Nachweis für iNOS war deutlich positiv in Fibroblast-ähnlichen Zellen, Fibroblasten und in endothelialen Zellen bei den Patienten mit RA. Ebenso konnte der TrkA-Rezeptor in vielen Zellen bei der RA im Vergleich zu den Kontrollprobanden vermehrt nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Fibroblast-ähnliche Synoviozyten und Fibroblasten. Von menschlichen synovialen Fibroblasten ist bekannt, dass sie NGF unter physiologischen Bedingungen exprimieren und dass unter pathologischen Verhältnissen (entzündlich) die NGF-Produktion und -Ausschüttung vermehrt stattfindet (Manni et al., 2003). Pozza et al. (2000) wiesen in Bereichen mit verstärkter Neoangiogenese auch vermehrte TrkA-Reaktivität nach.

Auch bei experimentell induzierter Arthritis bei Ratten und Mäusen konnten in den entzündlich veränderten Gelenken auch hohe NGF-Titer nachgewiesen werden (Aloe et al., 1992b; Aloe et al., 1993).

4.2 Juvenile chronische Arthritis

In einer großen Studie (Falcini et al., 1996b) wurde bei **80** Kindern mit juveniler chronischer Arthritis im Serum die NGF-Konzentration gemessen. Dabei wurden die Erkrankungen unterteilt

in **17** mit systemischen Verlauf (Temperatur > 38.5°C, Gelenkschwellung von 1 und mehr Gelenken, Hb < 10 g/dl und BSG > 25 mm/h), **39** mit polyartikulärer Verlaufsform (mit Gelenkschwellungen von > 5, BSG > 25 mm/h) und **24** Kinder mit oligoartikulärem Befall (Gelenkschwellung von 1 bis 4 Gelenken). Zusätzlich wurden unterschieden zwischen zum Zeitpunkt der Untersuchungen sich in aktiver Phase befindenden Kindern (**53** Kinder) und in inaktiver Phase befindenden Kindern (**27** Kinder). Benutzt wurde die two site ELISA Methode mit Anwendung von anti-NGF-Antikörpern. Als Kontrollgruppe wurden 40 gesunde Kinder herangezogen.

In allen drei Gruppen waren die gemessenen NGF-Level in der aktiven Phase der Erkrankung deutlich erhöht, wobei der systemische und polyartikuläre Befall höhere Werte als die oligoartikuläre Verlaufsform. Interessanterweise waren aber auch in der inaktiven Phase aller drei Gruppen die NGF-Werte im Vergleich zu den gesunden Kindern erhöht, wobei bei dem systemischen Befall die höchsten Werte zu finden waren. Zusätzlich wurde eine statistische Korrelation überprüft zwischen der NGF-Konzentration im Serum auf der einen Seite und der BSG, dem CRP und der Aktivität (score nach EULAR-Kriterien) auf der anderen Seite. Dabei fand sich eine sehr deutliche Korrelation zwischen NGF und BSG / CRP bei der systemischen Form; bei der polyartikulären Form eine deutliche Korrelation zwischen NGF und BSG (aber nicht CRP) und gar keine Korrelation bei der oligoartikulären Verlaufsform. Diese Ergebnisse zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen NGF-Höhe und Erkrankungsaktivität. NGF ist also bei der juvenilen c.P. eindeutig in das Entzündungsgeschehen – ob primär oder sekundär – involviert.

In der Studie von Aloe et al. (1992a) war die NGF-Konzentration in der synovialen Flüssigkeit des Kniegelenkpunktates unter anderem auch bei **1** Patienten mit juveniler chronischer Polyarthritis im Vergleich zu Gesunden, aber auch zur Gonarthrose deutlich erhöht.

4.3 Psoriasis

Bei den meisten Patienten sind die Psoriasisplaques über die Streckseiten der Ellbögen, der Kniegelenke und die Kopfhaut verteilt. Die Läsionen sind charakterisiert durch Erythem, Schuppen und Infiltrationen. Die Erkrankung kann auch generalisiert (Erythrodermie), mit erheblichen Pusteln und mit Psoriasisarthritis vorkommen. Zunächst wurde angenommen, dass

die Psoriasis eine Autoimmunerkrankung sei, wobei aber ein auslösendes Antigen bisher nicht gefunden wurde. Eine Antigen-induzierte T-Zell-Aktivierung allein erklärt aber nicht die symmetrische Verteilung, die Proliferation der Hautnerven, die vermehrte Ausschüttung von Neuropeptiden und das Köbner Phänomen (Bischoff und Dahinden, 1992; Bos et al., 1983; Calvo et al., 1992; Chang et al., 1997; Farber und Peterson, 1961). Das Köbner Phänomen beschreibt, dass äußere Reize/Traumen, wie Kratzen oder Scheuern von Kleidungsstücken, neue Psoriasis-effloreszenzen hervorrufen. Die symmetrische Anordnung der Plaques, die Abwesenheit des Befalles auf der Seite mit fehlender sensorischer Innervation (Raychaudhuri und Farber, 1993) und die Beobachtung, dass Stress die Psoriasis exazerbieren kann, lässt den Schluss zu, dass das Nervensystem ebenso eine wichtige Rolle bei dieser Erkrankung spielt. Bei einem Psoriasis-Patienten mit Plaquesbildung an beiden Kniegelenken verschwand nach einer Kniegelenksoperation mit der Folge einer kutanen Nervenschädigung der Plaque auf der operierten Seite.

Zunehmend entstand die Erkenntnis, dass das Prinzip der neurogenen Entzündung, in die auch NGF involviert ist, auch bei der Psoriasis eine wichtige Rolle spielt. In vielen Untersuchungen bestätigte sich die vermehrte Expression von Neuropeptiden wie Substanz P (SP), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) und Calcitonin Gene-related Protein (CGRP) mit einhergehender Proliferation von Hautnerven in psoriatisch veränderter Haut. Die Beteiligung dieser Neuropeptide an dem Entzündungsgeschehen der Psoriasis zeigt sich unter anderem an folgenden Zusammenhängen: 1. SP ist chemotaktisch für Neutrophile (Smith et al., 1993) und aktiviert T-Zellen (Calvo et al., 1992); 2. VIP wirkt mitogen auf Keratinozyten (Hægerstrand et al., 1989); 3. CGRP stimuliert synergistisch mit SP die Proliferation der Keratinozyten (Wilkinson, 1989) und 4. sind sowohl VIP, als auch CGRP potente mitogene Faktoren für endotheliale Zellen (Hægerstrand et al., 1990).

Da NGF bei der Regulierung der Innervation wichtig ist (Levi-Montalcini, 1987) und die vermehrte Ausschüttung von Neuropeptiden bewirkt (Aloe et al., 1997; Lindsay und Harmer, 1989), einschließlich in der Haut (Johansson und Liang, 1999; Wyatt et al., 1990), wurden verschiedene Untersuchungen betreffend NGF und Psoriasis Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse sind unten aufgeführt.

Zusammenfassend sind verschiedene Funktionen von NGF bei dem entzündlichen und proliferativen Prozess der Psoriasis relevant: NGF fördert die Proliferation von Keratinozyten (Wilkinson et al., 1994) und schützt sie vor der Apoptose (Pincelli et al., 1997); NGF degranuliert

Mastzellen und induziert ihre Migration (Aloe und Levi-Montalcini, 1977; Aloe et al., 1997; Pearce und Thompson, 1986), was beides frühe Ereignisse in psoriatischen Läsionen ist.

Zusätzlich aktiviert NGF T-Lymphozyten und rekrutiert entzündliche Zellinfiltrate (Bischoff und Dahinden, 1992; Lambiase et al., 1997; Thorpe et al., 1987b). Außerdem induziert NGF die Bildung von C-C-Chemokinen wie RANTES (**regulated upon activation normal T cell expressed and secreted**) in Keratinozyten (Raychaudhuri et al., 2000a). Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine, die im Sinne der Chemotaxis auf Zellen wirken; z. B. das Interleukin-8 (ein „C-X-C“-Chemokin), das neutrophile Granulozyten zum Entzündungsort lockt, oder das Mip-1 (ein „C-C“-Chemokin wie RANTES), das auf Monozyten wirkt. RANTES ist bei Psoriasis-Patienten mit Arthritis deutlich erhöht (Macchioni et al., 1998), vermag Memory-T-Zellen zu aktivieren und wirkt als chemotaktisches Signal für CD4+ Zellen.

Folglich ist denkbar, dass NGF über Chemokine den Einstrom von Mastzellen und Lymphozyten bewirkt und somit eine entzündliche Reaktion initiiert, die dann wiederum zur Pathogenese der Psoriasis beisteuert. Eine aktive Rolle der T-Zellen bei der Psoriasis zeigt sich daran, dass die speziell gegen CD4+-Zellen gerichtete Immuntherapie die Psoriasisplaques bessert (Gottlieb et al., 2000) und dass bei SCID-Mäusen (severe combined immunodeficient) transplantierte, normale Haut zu Psoriasishaut wird, wenn man Antigen-aktivierte T-Zellen intradermal appliziert (Wilkinson et al., 1994). In einem Psoriasis-Modell mit SCID-Mäusen konnten autologe Immunozyten, die mit NGF aktiviert wurden, transplantierte normale Haut zu Psoriasis-Haut umwandeln (Raychaudhuri et al., 2001). Auch wurde bei psoriatischen SCID-Mäusen der TrkA-Rezeptor für NGF mittels eines Rezeptorblockers (K252a) behandelt, was zu einer deutlichen Besserung der Psoriasis führte (Raychaudhuri et al., 2001).

Zusammenfassend spielt bei den pathobiochemischen Mechanismen NGF, die vermehrte Produktion von Neuropeptiden, Chemokinen und die Proliferation der kutanen Nerven eine wichtige Rolle. Warum und durch was NGF vermehrt produziert wird, bleibt immer noch offen (Review siehe Raychaudhuri und Raychaudhuri, 2004).

Betreffend der Zusammenhänge zwischen NGF und Psoriasis sind in der Vergangenheit vor allem NGF-Konzentrationen in den intraepidermalen Nerven und in betroffenen Hautgewebe untersucht worden.

In einer Untersuchungsreihe von Farber et al. (1996) wurde bei **28** Patienten mit Psoriasis die NGF-Rezeptor-Expression der Hautnerven untersucht und mit normaler Haut, sowie mit anderen entzündlichen Hauterkrankungen (Lichen Planus, Lichen simplex chronicus, allergische Kontaktdermatitis) verglichen. Hierbei kamen Antikörper, die gegen NGF-Rezeptoren gerichtet sind, und die Immunofluoreszenz-Methode zum Einsatz. Im Vergleich zur normalen Haut und allen anderen Erkrankungen wurde in den Psoriasis-effloreszenzen eine signifikante Erhöhung der epidermalen Nervenfasern nachgewiesen, die NGF-Rezeptoren produzieren. Dabei war die NGF-Rezeptoren-Dichte der kutanen Nerven auch in frühen Stadien der Psoriasis, sowie in ausgeprägten Plaques erhöht. Auffallend war, dass die Nerven in der Psoriasis-Haut deutlich länger waren als in allen anderen Gruppen. Das kann mit der Fähigkeit von NGF zusammenhängen, das Wachstum der Nervenfasern zu fördern. Da bei der Psoriasis die Keratinozyten proliferieren und vermehrt NGF ausschütten (siehe oben), könnte dies auch eine vermehrte Rezeptorbildung zur Folge haben.

In einer anderen Studie (Fantini et al., 1995) wurde mit der Two-site Elisa-Methode ebenso NGF in der Haut von **19** Psoriasis-Patienten aus erkrankten Arealen, nicht erkrankten Arealen von **20** Psoriasis-Patienten und Haut von **11** Gesunden untersucht. Es waren deutlich höhere Mengen an NGF in den Psoriasisplaques als in den beiden anderen Gruppen nachweisbar. Interessanterweise war die NGF-Konzentration in der nicht erkrankten Haut von Psoriasis-Patienten zwar niedriger als in den Plaques, aber dennoch deutlich höher als in völlig gesunder Haut. Diese Tatsache legt den direkten Zusammenhang zwischen NGF-Konzentrationen und dem Ausmaß an entzündlicher Hautveränderung nahe.

Raychaudhuri et al. (1998) untersuchten immunohistochemisch Gewebeproben von Psoriasisplaques (n=8), von nicht erkrankten Arealen bei Psoriasis (n=8), gesunder Haut (n=5) und von Lichen planus (n=5). Sie wiesen NGF ausschließlich in den Keratinozyten nach. Dabei betrug die Anzahl an NGF-positiven Keratinozyten pro mm² Epidermis bei der Psoriasis 84.7±46.3, bei nicht erkrankter Psoriasis-Haut 44.8±29.9, bei gesunder Haut 18.9±11.8 und bei Lichen Planus 7.5±16.9. Also war bei der psoriatischen Haut der höchste NGF-Nachweis in den Keratinozyten möglich, was mit vielen anderen Studien übereinstimmt.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Untersuchungsergebnissen haben Bull et al. (1998) in der nicht erkrankten Haut von Psoriasis-Patienten eine deutlich reduzierte TrkA-Immunoreaktivität (IR) und in von Psoriasis befallenen Arealen eine nahezu abwesende TrkA-IR gefunden. Zusätzlich wiesen sie eine deutlich reduzierte p75-IR von Nervenfasern in der Dermis und Epidermis sowohl bei Psoriasis befallener Haut, als auch bei nicht erkrankter Psoriasishaut nach. Bei gesunder Haut, bei der durch UVB-Bestrahlung eine Reizung hervorgerufen wurde, war ebenso die Immunoreaktivität für TrkA und p75 deutlich reduziert. Die Autoren folgern daraus, dass bei akuten entzündlichen Stimuli und bei chronisch entzündlichen Dermatosen die Expression beider Rezeptoren abnimmt. Zu dieser Untersuchungsreihe nahmen Raychaudhuri et al. Stellung (2000b). Sie haben in psoriatischer Haut und in nicht erkrankter Haut bei Psoriasis eine deutlich höhere Rezeptor-IR gefunden. Sie mutmaßen, dass die abweichenden Untersuchungsergebnisse von Bull et al. an den dünneren Kryoschichten, an der zu hohen Verdünnung der anti-NGF-Rezeptor-Lösung und an möglichen anderen in vitro Faktoren liegen könnte.

Weitere Untersuchungen (Aloe et al., 1992a) konzentrierten sich auf NGF bei entzündlichen Gelenkerkrankungen rheumatischer und anderer Genese. Dabei wurde die Synovialflüssigkeit entzündeter Gelenke auf NGF hin untersucht. Die Meßmethode zur Bestimmung der NGF-Konzentrationen wurde mittels „in vitro bioassay“, ELISA und immunhistochemisch mit NGF-Antikörpern durchgeführt.

Dabei zeigten sich erhöhte NGF-Spiegel auch in der synovialen Flüssigkeit von **4** Psoriasispatienten mit peripherer Gelenkbeteiligung.

Nakamura et al. (2003) untersuchten bei **38** Patienten mit Psoriasis mögliche Mediatoren für die Entwicklung von Pruritus bei Psoriasis vulgaris. Dabei wurden die 38 Patienten in zwei Gruppen unterteilt: eine mit Pruritus (n=23) und eine ohne (n=15). In der Gruppe mit Pruritus wurde eine erhöhte Menge an sensorischen Hautnerven (C-Nerven) in der Epidermis und oberen Schichten der Dermis nachgewiesen, was zu einer niedrigeren Juckreizschwelle dieser Patienten führen könnte. Die Hyperinnervation könnte die Folge von erhöhten NGF-Konzentrationen sein. NGF wurde immunohistochemisch und das Haut-Homogenisat mittels ELISA gemessen. Die Anzahl NGF-positiver Keratinozyten und die NGF-Konzentrationen im Homogenisat waren im Vergleich zu der Patientengruppe ohne Pruritus deutlich höher als in der Gruppe mit Pruritus.

NGF wird von Keratinozyten exprimiert (Pincelli et al., 1994) und die massive Proliferation der Keratinozyten bei der Psoriasis könnte die erhöhten NGF-Werte erklären und somit wiederum die vermehrte Anzahl der sensorischen Nerven. Die TrkA-Rezeptor-Immunreaktivität war bei der Gruppe mit Pruritus in den basalen Keratinozyten und in den Nervenenden ebenfalls deutlich erhöht. Dies könnte zu der vermehrten Zahl der Nerven und ihrer Aktivität und somit zum Pruritus führen. Ausserdem war eine erhöhte Immunreaktivität für SP- enthaltende Nerven perivaskulär zu finden. Da NGF die Expression von Neuropeptiden in primären, sensorischen Nerven reguliert (Amann et al., 1996), könnte auch die vermehrte Immunreaktivität auf NGF zurückzuführen sein. SP selber kann, wenn es beim Menschen in die Haut appliziert wird, Pruritus verursachen (Barnes et al., 1986). In dieser Studie wurde auch eine deutlich höhere Anzahl an degranulierten Mastzellen in der Gruppe mit Pruritus gefunden. Auch dort spielt wahrscheinlich NGF eine Rolle, da es die Degranulierung der Mastzellen fördert (Lewin et al., 1994).

Zusätzlich wurde eine Korrelation zwischen Pruritus und vermehrten Mengen an E-Selectin in vaskulären endothelialen Zellen, vermehrte ELAM (endothelial-leucocyte adhesion molecules) und herabgesetzte NEP (neutrale Endopeptidase, ein Neuropeptid-verringendes Enzym) in den basalen, epidermalen Schichten, sowie im Endothel der Blutgefäße gefunden. Selectine sind Glykoproteine an der Zelloberfläche von Endothelzellen (Adhäsionsmoleküle), die das Anheften von Leukozyten an der Gefäßwand vermitteln und die Zellmigration bei der Entzündungsreaktion einleiten (Lasky, 1995). Unterschieden werden E-Selectin (aus dem Gefäßendothel), L-Selectin (aus Leukozyten) und P-Selectin (aus Thrombozyten=Plättchen). NEP kann SP inaktivieren und wird als wichtiger Regulator der neurogenen Entzündung betrachtet (Scholzen et al., 1998). In der Gruppe mit Pruritus wurden auch höhere Mengen an IL-2 positiven Lymphozyten gefunden.

Zusammenfassend scheint der Pruritus durch verschiedene Mediatoren in der Haut beeinflusst zu sein: neurogene Faktoren (vermehrte Innervation, SP, NEP, NGF und TrkA), durch aktivierte Mastzellen, IL-2 und E-Selectin.

4.4 Morbus Reiter

In der bei der rheumatoiden Arthritis aufgeführten Studie (Halliday et al., 1998) wurden auch andere Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis untersucht worden, unter anderem

auch **2** Patienten mit Kniegelenksarthrititis im Rahmen eines Morbus Reiter. Im Kniegelenkspunktat waren höhere NGF-Werte als bei gesunden Kontrollpatienten vorhanden. Ein signifikanter Unterschied zu den Kniegelenkspunktaten der chronischen Polyarthrititis bestand nicht.

4.5 Chondrokalzinose

Bei **3** Patienten mit Arthritis des Kniegelenkes bei Chondrokalzinose wurden bei der schon unter Halliday et al. (1998) aufgeführten Studie die Synovialflüssigkeit auf NGF hin untersucht, wobei sich auch hier erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Kontrollpunktaten fanden.

4.6 Spondarthritis ankylosans

Bei einem Patienten mit Spondylitis ankylosans mit peripherer Kniegelenksbeteiligung waren bei der Untersuchung der synovialen Flüssigkeit auf NGF hin deutlich erhöhte Werte im Vergleich zur synovialen Flüssigkeit von Gesunden gefunden worden (Halliday et al., 1998).

In einer weiteren Untersuchungsreihe (Aloe et al., 1992a) waren **3** Patienten mit Spondylitis ankylosans synoviale Flüssigkeit vom Kniegelenk entnommen worden. Dabei wurde die NGF-Konzentration mittels in vitro enzym immuno assay und ELISA bestimmt. Wie bei der c.P. waren auch hier erhöhte Werte gefunden worden, während bei den gesunden Kontrollpatienten NGF nicht nachweisbar war. Auch war im Vergleich zu den entzündlichen Erkrankungen, zu denen die Spondarthritis mit peripherer Gelenkbeteiligung gehört, bei der Gonarthrose in derselben Untersuchungsreihe die NGF-Konzentration niedriger.

4.7 HLA B27 positive Arthritiden

Halliday et al. (1998) haben in einer großen Studie die synoviale Flüssigkeit aus dem Kniegelenk von RA-Patienten mit anderen entzündlichen Kniegelenksbefall und mit gesunden Kontrollprobanden verglichen. In dieser Studie waren auch **3** Patienten mit HLA B27 assoziierten Arthritiden. Die NGF-Konzentrationen waren im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht und waren ähnlich hoch wie bei den RA-Patienten.

4.8 Infektiöse Arthritis des Kniegelenkes

In der oben aufgeführten Studie (Halliday et al., 1998) gehörten zu der Gruppe der entzündlichen Kniegelenkserkrankungen auch **2** Patienten mit einer infektiösen Arthritis. Auch hier waren die NGF-Konzentrationen in der synovialen Flüssigkeit deutlich erhöht. NGF scheint zweifellos eine Rolle bei entzündlichen Gelenkserkrankungen zu spielen.

4.9 Systemische Sklerodermie

Die progressive systemische Sklerose wird als entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes angesehen mit typischer Fibrose, Atrophie und Induration der Haut, aber auch verschiedenen Gelenkaffektionen, sowie einem progressiven Befall innerer Organe infolge diffuser Vaskulitiden. Die Erkrankung befällt sowohl das Bindegewebe (Strehlow und Korn, 1998) als auch kleine Gefäße (Matucci-Cerinic et al., 1995). Charakteristika sind ein pathologisch aktiviertes Immunsystem (White, 1994), endotheliale Schädigungen (Matucci-Cerinic et al., 1995), Aktivierung von Fibroblasten mit der Folge von Kollagen-Akkumulation (Strehlow und Korn, 1998), was dann zur Fibrose der Haut und verschiedener innerer Organe führt. Das periphere Nervensystem ist häufig involviert, ob primär oder sekundär ist unklar. Es spielt über die Dysregulation des Gefäßtonus (Kahaleh und Matucci-Cerinic, 1995), der in den frühen Phasen der Sklerodermie verändert ist (Matucci-Cerinic et al., 1995), eine wichtige Rolle.

In einer von Piga et al. (2000) durchgeführten Untersuchungsreihe wurden bei **7** Patienten, die an systemischer Sklerodermie erkrankt waren, die NGF-Konzentrationen der Haut am Unterarm mit der pulmonalen epithelialen Permeabilität (PEP: Bestimmung der Lungenventilation szintigraphisch mit ^{99m}Technetium-DTPA-Clearance) verglichen. Dabei fand sich bei allen Patienten eine enge Korrelationen zwischen den immunohistochemisch nachgewiesenen erhöhten NGF-Werten und der erhöhten PEP. Unter der Annahme, dass die pathogenetischen Mechanismen in allen befallenen Organen ähnlich ist und die Wirkung von NGF nicht nur auf die Haut beschränkt bleibt, scheint NGF bei der Systemischen Sklerodermie nicht nur in der Haut, sondern auch bei der erhöhten PEP der Lunge eine Rolle zu spielen.

Tuveri et al. (1993) untersuchten bei **8** Patienten mit Systemischer Sklerose immunohistochemisch die Haut am Unterarm auf den Gehalt von NGF und Mastzellen hin. 4 der Patienten hatten einen diffusen, 4 einen lokalisierten Befall. 6 von den 8 Patienten hatten eine Beteiligung innerer Organe. Drei der Patienten wurden mit D-Penicillamin behandelt, die anderen nicht.

Sowohl bei den Sklerodermie-Patienten, als auch bei den gesunden Kontrollprobanden ließ sich NGF in der Nähe von Schweißdrüsen und Haarfollikeln nachweisen. Bei den Sklerodermie-Patienten war die Dichte sowohl von NGF-positiven Zellen, als auch von Mastzellen deutlich höher. Diese vermehrte Dichte war bei den Patienten in frühen Phasen der Erkrankung viel deutlicher, als bei denen in späteren Phasen. Die Einnahme von D-Penicillamin schien keinen Einfluss auf die Dichte NGF-positiver Zellen zu haben.

In einer vorangegangenen Studie wurde schon beobachtet, dass in frühen Stadien der Sklerodermie Mastzellen vermehrt sind und in späteren Phasen wieder abnehmen (Hawkins et al., 1985). Es wird vermutet, dass Mastzellen mit den Substanzen, die sie ausschütten die Proliferation von Fibroblasten und die Gefäßabnormalitäten fördern (Mican und Metcalfe, 1990) und somit zur Pathophysiologie der Sklerodermie beitragen. Zum einen bewirkt NGF über seinen Rezeptor die Proliferation, Hypertrophie und Degranulierung der Mastzellen (Aloe und Levi-Montalcini, 1977; Pearce und Thompson, 1986), zum anderen speichern Mastzellen NGF und schütten es aus (Leon et al., 1994). Die Sklerodermie geht mit einer exzessiven Kollagenproduktion von Fibroblasten einher. Fibroblasten können NGF produzieren und exprimieren (Davies et al., 1987). Das produzierte NGF kann dann weitere Mastzellen aktivieren. So könnte eine entzündliche Kaskade exazerbieren, die in einer Endlos-Schleife sich selbst unterhält und an der NGF einen großen Anteil hat.

In der Studie (Halliday et al., 1998) wird ein Patient beschrieben, bei dem das befallene Kniegelenk punktiert wurde und der NGF-Spiegel bestimmt wurde mit dem Ergebnis erhöhter Werte im Vergleich zur Synovialflüssigkeit gesunder Probanden.

In einer großen Studie (Matucci-Cerinic et al., 2001) wurden bei **44** Patienten mit Sklerodermie die NGF-Werte im Serum mittels two site ELISA und die Konzentrationen für die Neuropeptide VIP (vasointestinal peptide) und NPY (Neuropeptid Y) gemessen. Als Kontrollgruppe dienten **40** gesunde Probanden. Die Werte wurden auch im Hinblick auf den lokalen und systemischen

Befall, sowie artikuläre Affektionen, Grad des Lungenbefalls, Beteiligung des peripheren Nervensystems, BSG, Rheumafaktoren, ACE, Herzbefall etc. untersucht. Die häufigste gemeinsame viszerale Veränderung waren der Lungenbefall und die Beteiligung des peripheren Nervensystems (elektromyographisch untersucht). **13** der Patienten hatten auch Gelenkbeteiligungen.

In allen Sklerodermie-Seren waren deutlich erhöhte NGF-Konzentrationen nachweisbar (61.3 ng/ml versus Kontrollgruppe 8.3 ng/ml), wobei die Werte bei dem diffusen, systemischen Befall höher waren (95 ng/ml), als bei lokalem Befall (28 ng/ml). Erstaunlicherweise war im ermittelten Durchschnitt kein Unterschied der NGF-Werte zwischen den Patienten mit (46 ng/ml) und ohne peripheren Nervensystembefall (40.1 ng/ml) zu eruieren. Allerdings waren die absolut gesehenen Werte bei Nervenbefall vereinzelt am höchsten. In der Gruppe mit Gelenkbefall waren statistisch höhere Werte zu finden (117 ng/ml) als in der Gruppe ohne Gelenkbefall (20.25 ng/ml).

Zusätzlich wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe von NGF und dem pulmonalen Funktionstest (CO-Transfer Test) gefunden. Zwischen den Neuropeptiden, Hautscore, BSG, Nervenbeteiligung, ACE, von Willebrandfaktor, Antitopoisomerase, Zentromer-Antikörper sowie weiteren Lungenfunktionstests wurde keine statistisch signifikante Korrelation gefunden. Eine deutliche Erhöhung der Spiegel vom von Willebrandfaktor und Erniedrigung der Werte für ACE wurde bei den Sklerodermiepatienten gemessen.

Unter den anderen Neuropeptiden waren nur die VIP-Konzentrationen bei den Sklerodermie-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden erhöht und waren am höchsten bei ausgeprägter diffuser Hautbeteiligung. Die Werte für NPY erreichten keine statistische Signifikanz.

Inwieweit NGF von den proliferierenden Fibroblasten oder von dem peripheren Nervensystem zum Zwecke reparativer Prozesse vermehrt produziert wird, oder primär das erhöhte NGF vorhanden ist und sekundär die entzündliche Kaskade in Gang setzt, ist noch unklar. Es ist bekannt, dass NGF bei Ischämie Zellschäden reduziert, z.B. über die Produktion von freien Sauerstoffradikalen (Smeyne et al., 1994), Stimulierung des Glutathionmetabolismus (McMahon et al., 1994), gesteigertes Uptake für Cystein und Cystin (Averill et al., 1995) und Verlängerung der Halbwertszeit von γ -Glutamylcystein Synthetase mRNA (Kaplan et al., 1991b). Auch bei anderen Gefäßerkrankungen wie zum Beispiel der koronaren Herzerkrankung wurden nach kurzen myokardialen Ischämien rasch erhöhte Werte für NGF im Myokard gefunden, was als Reparaturvorgang an der postischämischen Dysfunktion der sympathischen coronaren Nerven

interpretiert wurde (Levine et al., 1985). Da bei der Sklerodermie auch ischämische Reperfusionvorgänge typisch sind, könnten die erhöhten NGF-Werte bei den Sklerodermie-Patienten unter anderem auch damit zusammenhängen. Schwer zu interpretieren ist das Fehlen einer Korrelation in dieser Studie zwischen NGF und Befall des peripheren Nervensystems. Die Ereignisse im perineuralen Gewebe werden wahrscheinlich im Serum nicht reflektiert. Somit ist auf jeden Fall deutlich, dass die Quelle der vermehrten Menge an NGF nicht durch das Nervensystem allein erklärbar ist. Die erhöhte NGF-Produktion bei dieser autoimmunen Erkrankung ist durch die infiltrierenden und pathologisch aktivierten Zellen des Immunsystems denkbar.

4.10 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Der SLE ist eine entzündliche Bindegewebserkrankung charakterisiert durch eine Hyperaktivität der B-Zellen und erheblich gestörter Immunregulation mit exzessiver Produktion von Immunglobulinen und Autoantikörpern.

In einer Untersuchungsreihe (Bracci-Laudiero et al., 1993) wurde NGF im Serum bei **16** SLE-Patienten im Vergleich zu 15 gesunden Kontrollpatienten untersucht. Zum Nachweis des NGF wurde die two site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) angewendet.

Zusätzlich wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt abhängig von der Aktivität der Erkrankung: nach den ARA-Kriterien hatte die erste Gruppe einen Score von 1-4 und die zweite Gruppe einen Score von >4.

Alle SLE-Patienten hatten im Serum deutlich höhere NGF-Konzentrationen als die gesunde Kontrollgruppe. Interessanterweise waren die NGF-Level im Serum der Patienten mit einem Score >4 nochmals deutlich höher als die Patienten mit einem Score von 1-4.

Zusätzlich wurde in derselben Studie eine Familie mit einem erkrankten Vater (score <4), einer erkrankten 12-jährigen Tochter (Score >4) und zwei gesunden Töchtern untersucht. Vater und erkrankte Tochter hatten deutlich erhöhte Werte im Vergleich zu den nicht erkrankten Töchtern. Auch hier war bei dem Vater, der ja einen niedrigeren Score hatte, die Werte niedriger als bei seiner Tochter (Vater: 12.5 ± 2 pg/ml, erkrankte Tochter: 21 ± 2.5 pg/ml, gesunde Töchter: 5.7 ± 1.3 pg/ml).

Somit liegt eine Korrelation zwischen der NGF-Höhe und der Aktivität dieser Erkrankung nahe.

Aalto et al. (2002) untersuchten bei **10** Kindern mit SLE die NGF-Konzentrationen im Serum mittels two-site ELISA. Als Kontrollpersonen dienten 25 Kinder mit zum Teil orthopädischen Problemen nicht entzündlicher Natur, aber auch mit entzündlichen Gelenkerkrankungen. Die NGF-Werte bei den SLE-Kindern waren signifikant höher (zwischen 470 und 17800 pg/ml), als bei den Kontrollkindern (zwischen 23-1942 pg/ml). Bei den SLE-Kindern korrelierte die NGF-Konzentration mit der Schwere der Erkrankung, gemessen am SLE Disease Activity Index (SLEDAI). Interessanterweise waren in der Kontrollgruppe die NGF-Werte bei einem Kind mit juveniler Arthritis (1408 pg/ml) und bei einem Kind mit Oligoarthritis (1942 pg/ml) die höchsten und erreichten Werte im Bereich einiger SLE-Patienten. Auch diese Untersuchungsreihe bestätigt einen Zusammenhang zwischen erhöhten NGF-Konzentrationen und entzündlichen/autoimmunen Erkrankungen.

Allerdings ist in dieser Untersuchungsreihe die Wahl der Kontrollgruppe mit zum Teil entzündlich-rheumatischen Erkrankungen nicht so geschickt. Als Vergleichsgruppe sollten eher gesunde Kinder dienen. Denn andere Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche rheumatisch-entzündliche Erkrankungen und auch arthrotisch-degenerative Veränderungen mit erhöhten NGF-Werten einhergehen.

Auch bei Mäusen mit Lupus (NZB/W Hybriden) zeigten sich zwei bis dreifache Erhöhung der NGF-Konzentrationen im Serum, in den Nieren und Milz (Bracci-Laudiero et al., 1996a).

4.11 Vaskulitiden

4.11.1 Kawasaki-Syndrom

Erstmals als mukocutanes Lymphknotensyndrom von Kawasaki 1967 beschriebene fieberhafte Erkrankung, die fast ausschließlich Kinder im Alter von 1 bis 8 Jahren betrifft. Der Beginn ist akut mit Fieber, Konjunktivitis, Ödemen an Händen und Füßen, Exanthem stammbetont. Die Hälfte der Patienten hat Arthralgien und Synovitiden. Komplizierend kommt recht häufig eine Arteriitis hinzu, die besonders bedrohlich ist, wenn die Koronargefäße betroffen sind. Für die Arteriitis sind Endothel-Schädigungen verantwortlich.

In einer Studie von Falcini et al. (1996a) wurden die NGF-Level im Serum bei **12** Kindern mit Kawasaki-Syndrom mittels der Two-site-ELISA-Methode gemessen. Im Anbetracht dessen, dass der akute Beginn beim Kawasaki-Syndrom mit hohem Fieber einhergeht, wurden im Vergleich dazu auch **12** Kinder mit hochfieberhaftem viralen Infekt des oberen Respirationstraktes untersucht. Mit dieser Vergleichsgruppe sollten evtl. Unterschiede der NGF-Konzentrationen herausgearbeitet werden, die über das gemeinsame Symptom des hohen Fiebers hinausgehen. Schließlich wurden beide Gruppen noch mit einer gesunden, fieberfreien Kontrollgruppe von **12** Kindern verglichen. Bei allen Kindern wurden die 1. Blutentnahme in der akuten Fieberphase vor Beginn einer Medikation durchgeführt und beim Kawasaki-Syndrom einen Monat später in der Genesungsphase nach Therapie mit Aspirin und intravenöser Gabe von Gammaglobulinen. In die Untersuchung wurden Entzündungsparameter wie BSG, CRP, Hb etc. (siehe Tabelle) einbezogen.

Das zirkulierende NGF im Serum war bei den Kindern mit Kawasaki-Syndrom deutlich erhöht. Die höchsten Werte waren in der akuten Phase, die durch hohes Fieber charakterisiert ist, und waren nach intravenöser Gabe von Gammaglobulinen deutlich niedriger, blieben aber immer noch höher als bei den Kindern mit dem Infekt des oberen Respirationstraktes in der fieberhaften Phase. Die Kinder mit dem Infekt hatten genauso hohes und lang andauerndes Fieber wie die Kinder mit dem Kawasaki-Syndrom. Dennoch waren die NGF-Werte deutlich unterschiedlich. Die BSG der Patienten mit dem Respirationstrakt-Infekt war höher als bei der gesunden Kontrollgruppe und niedriger als beim Kawasaki-Syndrom. Selbst in den Fällen, bei denen die BSG ähnlich der Werte beim Kawasaki-Syndrom waren, sind die NGF-Werte niedriger gemessen worden. Die deutlich niedrigeren Werte von NGF beim Infekt verglichen zum Kawasaki-Syndrom zeigen, dass NGF nicht mit Fieber, welches bei beiden Erkrankungen ein klinisches Symptom ist, korreliert. Die Korrelation von NGF mit den anderen Entzündungsparametern weist darauf hin, dass NGF beim Kawasaki-Syndrom ein Bindeglied für den Entzündungsprozess und Erkrankungsaktivität ist.

Da das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ein zuverlässiger Parameter für die Zellschädigung des Endothels ist, wurden zusätzlich die Plasma-Konzentrationen von ACE gemessen. In der aktiven Phase des Kawasaki-Syndroms waren die ACE-Werte deutlich erniedrigt im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern, stiegen nach Therapie mit Immunglobulinen an, erreichten aber nicht die Werte der Normalgruppe. Die ACE –Werte verhielten sich umgekehrt zu den NGF-Werten.

Tab. 1. Hämatologische Parameter der Erkrankungsaktivität, NGF im Serum, ACE im Plasma beim Kawasaki-Syndrom und in der Kontrollgruppe (Falcini et al., 1996a)

	Kontrollgruppe	Kawasaki-Syndrom in der Akutphase	Kawasaki-Syndrom nach iv Immunglobulingabe	Viraler Infekt des oberen Respirationstraktes
BSG (mm/h)	7 ± 6	80 ± 23	12 ± 2	42 ± 8
Hb (g/dl)	11.5 ± 1.7	8.5 ± 1.1	11.3 ± 1.2	11.1 ± 1.3
Leukozyten/mm ³	6950 ± 1900	32.000 ± 16.000	10.200 ± 2300	7150 ± 2200
Thrombozyten 10 ³ /mm ³	380 ± 90	620 ± 324	982 ± 187	365 ± 145
CRP (mg/dl)	<0.25	23 ± 5	<0.25	0.35 ± 0.5
NGF (pg/ml)	6.5 ± 2.03	1219.54 ± 1600	277.08 ± 245.64	30.18 ± 44.70
ACE (pmol/mol/min)	10.1 ± 4.2	2.8 ± 1.7	4.8 ± 2.7	9.1 ± 0.99

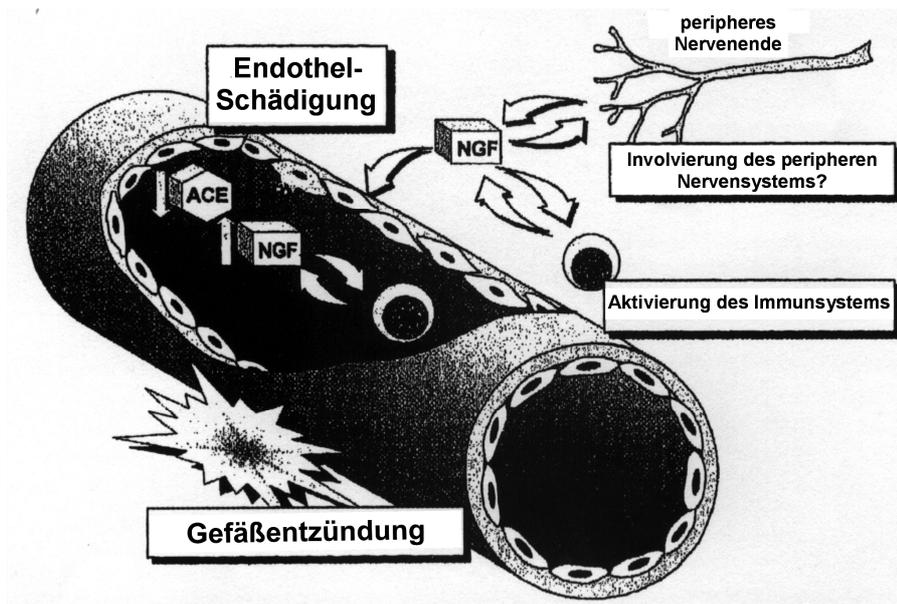


Abb. 2 Mögliche Beteiligung von NGF an entzündlichen Gefäßprozessen (nach Falcini et al., 1996a)

Die niedrigen ACE-Werte reflektieren die Endothelschädigung und somit indirekt die Entzündung, während die hohen NGF-Werte der direkte Ausdruck der Entzündung sein könnten. Da die Endothelzellen selbst kein NGF produzieren, sind die erhöhten Werte nur durch andere Mechanismen erklärbar. Beim Kawasaki-Syndrom und anderen entzündlichen

Gefäßerkrankungen spielen Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α eine wichtige Rolle (Lin et al., 1993) und ihre mögliche Stimulierung der NGF-Ausschüttung aus peripheren Nervenenden ist auch von Falcini et al. (1996b) in der Studie über die juvenile RA vermutet worden. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass diese Zytokine nicht nur die Gefäßwand, sondern auch die perivaskulären Nervenenden involvieren könnten und einen Anstieg des NGF bewirken könnten. Es ist aber auch bekannt, dass NGF von Lymphozyten produziert wird (Santambrogio et al., 1994). Das Kawasaki-Syndrom ist sowohl durch erhöhte Lymphozytenaktivierung, als auch durch abnorme Produktion der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Lin et al., 1993) gekennzeichnet, von denen wiederum gezeigt wurde, dass sie die NGF-Produktion erhöhen können (Frei et al., 1989; Gadiant et al., 1990; Lindholm et al., 1987; Otten et al., 1990; Spranger et al., 1990; Steiner et al., 1991). Diese abnorme Zytokin-Produktion könnte dann wiederum die NGF-Produktion der Lymphozyten induzieren, sodass NGF in der Immunpathologie dieser Erkrankung als ein parakriner/autokriner Faktor an der Regulierung der Lymphozyten- und Nerven-Funktion mitbeteiligt sein könnte.

Nach der Therapie des Kawasaki-Syndroms waren die hämatologischen Entzündungsparameter (BSG, CRP, etc.) wieder im Normbereich, während die ACE-Werte noch erniedrigt und die NGF-Werte erhöht blieben. Folglich könnten diese beiden Parameter als Marker für die Erkrankungsaktivität auch in der scheinbar inaktiven Phase, wenn die Entzündungsparameter im Blut (BSG etc.) schon längst wieder normal sind, herangezogen werden.

4.11.2 Churg-Strauss-Syndrom und Panarteriitis nodosa

Yamamoto et al. (2001) haben Biopsien des Nervus suralis bei **12** Patienten mit Churg-Strauss-Syndrom und bei **10** Patienten mit Panarteriitis nodosa auf die mRNA-Level von NGF, CNTF (ciliary neurotrophic factor), GDNF (glia cell line-derived neurotrophic factor) und Interleukin-6 (IL-6). Ein gemeinsames Symptom bei allen Patienten war die durch die Vaskulitis (Vasa nervorum) bedingte Neuropathie. Die mRNAs wurden mit radioisotoper RT-PCR gemessen. Als Kontrolle dienten 7 Biopsien post mortem ohne morphologische Veränderungen des Nervus suralis. Die Veränderungen der einzelnen neurotrophen Substanzen korrelierten nicht miteinander. Dies spricht dafür, dass diese Substanzen unabhängig von einander bei Nervenläsionen exprimiert werden. NGF war im Vergleich zu der Kontrollgruppe 2,3-fach, GDNF 4,8-fach und IL-6 5,2-fach erhöht. Die CNTF mRNA war jedoch erniedrigt. Die NGF

mRNA zeigte eine enge Korrelation zu dem Grad der Invasion von T-Zellen und Makrophagen ins Endoneurium, was eine wichtige Rolle bei der Progression der Vaskulitis-Neuropathie spielt. Zudem zeigte NGF auch eine Tendenz, mit der Dichte der nichtmyelinisierten Fasern zu korrelieren. Die Expression der CNTF mRNA korrelierte in hohem Masse mit der Dichte dieser Fasern. Zwischen den histologischen Parametern und GDNF, sowie IL-6 waren keine Zusammenhänge erkennbar.

Ob die erhöhten NGF-Werte aus der Produktion der erhöhten Zellzahl an Makrophagen und T-Zellen stammt, und ob dies Ausdruck beginnender Reparaturvorgänge ist, bleibt unklar. Es könnte sich aber hier auch um eine „negative Seite“ des NGF mit Unterhaltung des entzündlichen Prozesses handeln.

4.11.3 Arteriitis temporalis superficialis

Saldanha et al. untersuchten (1999) bei 17 Patienten die Biopsien von der Arteria temporalis superficialis. Dabei hatten 7 Patienten eine histologisch gesicherte Riesenzell- Arteriitis mit zellulären Infiltraten, Riesenzellen und fast kompletten Verschluss des Arterienlumens. Die anderen 10 Patienten hatten keine entzündlichen Veränderungen. Alle hatten das Symptom des Kopfschmerzes. Die cranialen Gefäße enthalten eine reichliche Versorgung mit nociceptiven Fasern aus dem Trigemini-System, die die Neuropeptide Substanz P und Calcitonin gene related peptide (CGRP) enthalten (Edvinsson et al., 1987; Jansen et al., 1986; Jansen et al., 1992; Uddman et al., 1986b). Die Autoren vermuten, dass die Ausschüttung dieser Peptide zur neurogenen Entzündung führen und somit den vaskulären Kopfschmerz potenzieren könnten (Edvinsson und Goadsby, 1995; Goadsby und Edvinsson, 1993; Moskowitz, 1984). Die Sensitivität der Nociceptoren und die Ausschüttung ihrer Neuropeptide sind wiederum von NGF abhängig (Donnerer et al., 1992; Lewin und Mendell, 1993). NGF wird von den glatten Muskelzellen der Gefäße produziert (Anand et al., 1997; Tuttle et al., 1993) und agiert über den TrkA-Rezeptor der Nociceptoren (DiStefano et al., 1992; Woolf et al., 1994).

Die CGRP-Immunreaktivität (IR) war im Vergleich zu normalen Gewebe der Arterien-Biopsien in den Arteriitis-Proben deutlich reduziert. Der Nachweis von TrkA gelang in zahlreichen kleinen Nervenfasern an der Grenze zwischen der Adventitia und Media, sowie in kleinen Nervenfasern in der direkten Umgebung des Gefäßes. Allerdings gab es keinen Unterschied zwischen der durch die Arteriitis veränderten Gewebeproben und den normalen Proben. Das könnte daran liegen,

dass bei allen 17 Patienten mehrere Tage zuvor mit einer hohen Steroid-Dosis begonnen wurde (30-60 mg). Von den Corticosteroiden ist nachgewiesen worden, dass sie in kultivierten Fibroblasten die NGF-Synthese reduzieren können (Siminoski et al., 1987). Wahrscheinlich ist wegen der Steroidtherapie keine eindeutige Aussage möglich.

4.12 Morbus Behçet

Der Morbus Behçet ist eine möglicherweise virusbedingte, familiär gehäufte Autoimmunerkrankung mit einer hohen Assoziation zu dem Antigen B5 des HLA-Systems mit der charakteristischen Trias von rezidivierenden Aphthen der Mundschleimhaut, genitale Ulzerationen und okulären Manifestationen wie Uveitis anterior. Ebenfalls zu den Hauptsymptomen gehören Hauterscheinungen wie Erythema nodosum, Follikulitis, Pyoderma etc. Von den Nebensymptomen ist der Gelenkbefall mit Oligoarthritis der häufigste, es findet sich aber auch häufig eine ISG-Arthritis. Seltener Nebensymptome sind Gefäßbefall (Arteriitiden, Aneurysmen etc.), gastrointestinale Veränderungen und ZNS-Befall wie Meningoenzephalitis und Hirnstammsyndrom.

In einer Untersuchungsreihe von Jockers-Scherübl et al. (1996) wurden die NGF-Konzentrationen im Serum bei **27** Patienten mit Morbus Behçet im Vergleich zu 27 Gesunden mittels two-site ELISA gemessen. Von den Erkrankten hatten **8** eine neurologische Beteiligung (rezidivierende aseptische Meningitis (3), Meningoenzephalitis mit Epilepsie (2), Enzephalitis (2), Pyramidenbahnzeichen (1)). **5** Patienten hatten psychiatrische Symptome (Depression (3), organische Psychose (1) und Demenz (1)). **3** Patienten litten unter Arthralgien und Weichteilschwellungen und **1** Patient hatte ein Erythema nodosum entwickelt.

Die NGF-Werte im Serum zeigten eine erhebliche Erhöhung bei den Patienten mit Morbus Behçet (um 289 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Durchschnittswert in der Kontrollgruppe von 18.3 pg/ml=100%). Teilte man aber die Erkrankten in zwei Untergruppen auf, so waren die Unterschiede noch signifikanter: bei der Gruppe mit geringeren Komplikationen waren die Werte um 123% erhöht. Bei den **6** Patienten mit systemischen Komplikationen (Enzephalitis, Meningoenzephalitis und Gelenkbefall mit Weichteilschwellungen) waren die Werte sogar um 917% erhöht.

NGF scheint nicht ein Marker für den ZNS-Befall an sich zu sein, sondern die

Ausprägung der systemischen Verlaufsform unabhängig der Organart/Manifestation scheint mit einer starken NGF-Erhöhung einherzugehen.

Im Gegensatz zu der o.g. Studie fanden Accorinti et al. (2003) bei **10** Patienten mit diffuser Uveitis und retinaler Vaskulitis bei Morbus Behçet keine erhöhten NGF-Konzentrationen im Serum. Sie untersuchten die Konzentrationen von NGF, IL-2, IL-10, IFN- γ und TGF- β im Serum. Es wurden Blutproben zu einer Phase der Erkrankung entnommen, bei der alle Patienten keine okkulären oder andere Symptome hatten. Zum Vergleich wurden 10 gesunde Probanden hinzugezogen. Erstaunlicher Weise waren die NGF-Werte bei den Behçet-Patienten niedriger als bei den Gesunden. IL-2 und IFN- γ waren deutlich erhöht und IL-10, sowie TGF- β waren ähnlich wie bei den Gesunden. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen den NGF-Werten und den Zytokinen. Auch bei den vier Patienten, die im Verlauf der Erkrankung auch neurologische Symptome hatten, ergaben sich keine erhöhten NGF-Werte. Diese Ergebnisse könnten an dem Fehlen von Krankheitssymptomen zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder an der medikamentösen Behandlung liegen. Drei Patienten wurden mit Cyclosporin A und Steroiden, zwei mit Cyclosporin A in Kombination mit Azathioprin und Steroiden, ein Patient mit Cyclosporin A und ein Patient mit Steroiden als Monotherapie behandelt. Drei Patienten waren ohne medikamentöse Therapie, aber auch ohne Symptome.

4.13 Fibromyalgiesyndrom

Die cerebrospinale Flüssigkeit von Patienten mit primärem und sekundärem Fibromyalgie-Syndrom (FMS) wurde auf den Gehalt von NGF untersucht (Giovenco et al., 1999) und mit 35 Gesunden und 10 Patienten mit chronischen Schmerzen ohne die typischen diagnostischen Kriterien des FMS (chron. Dorsalgie, myofasziale Schmerzen, RA und Arthrose) verglichen. Die Gruppe von FMS-Patienten, die keine anderen entzündlichen oder chron. Schmerzzustände aufwiesen (primäres FMS), schloss **34** Patienten ein. Zusätzlich wurden noch **15** Patienten untersucht, bei denen eine sekundäre Form des FMS vorlag mit den klassischen Symptomen, aber als sekundär zu betrachten bei Erkrankungen wie SLE, RA, Sarkoidose, Psoriasisarthritis, juvenile PcP. Allerdings waren diese Erkrankungen Jahre zuvor aktiv und zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission.

Angewandt wurde die two-site EIA-Methode. In den Ergebnissen zeigten sich erhebliche individuelle Variationen in der NGF-Konzentration. Eindeutig erhöhte Werte im Vergleich zu den gesunden Probanden waren nur in der Gruppe der Patienten mit primärem FMS zu finden, während die Gruppen mit chronischen Schmerzen und sekundärem FMS keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Gesunden aufwies. Bei den Probanden mit FMS wurde der Versuch unternommen, den Schmerzzustand mittels des Tenderpoint-Index (Schmerzswellenintensität gemessen durch Fingerdruck und Dolorimetrie) zu messen. Es gab keine Korrelation der individuellen NGF-Level der FMS-Gruppe zu den klinisch gemessenen Schmerzzuständen, aber auch nicht zu den in früheren Studien gemessenen SP-Konzentrationen bei diesen Patienten (Russell et al., 1994).

Leider ist in dieser Publikation bei den Gruppen mit dem sekundären FMS und den chronischen Schmerzzuständen keine detaillierte Aufschlüsselung der NGF-Konzentrationen bei den einzelnen Krankheitsbildern veröffentlicht worden. Interessant wäre zu wissen, ob zum Beispiel bei chronischem Rückenschmerz der NGF-Wert niedriger als bei entzündlichen Erkrankungen wie der RA oder Psoriasisarthritis war.

Ob die niedrigen NGF-Level in der Gruppe mit der Sekundären FMS im Zusammenhang mit der Remission der zugrunde liegenden Erkrankungen (siehe oben) steht und in der aktiven Phase höhere Werte auffindbar wären, bleibt offen. Ob erhöhte Werte für NGF ein Faktor für die Pathogenese der FMS ist, oder ein Teil der ablaufenden Kaskaden und biochemischen Mechanismen bei chronischen muskuloskelettalen Schmerzen ist, bleibt weiterhin offen.

4.14 Spinale Nervenkompressionssyndrome

Untersuchungsreihen zeigen die Beteiligung von NGF an der embryonalen Entwicklung auch des Skelettsystems. Frenkel et al. (1990) wiesen NGF bei Hühnerembryonen im Knochen und Knorpel nach. Grills und Schuijers (1998) wiesen NGF immunohistochemisch bei Ratten in periostalen Knochen-Progenitorzellen, in Stromazellen des Knochenmarks, Osteoblasten, jungen Osteozyten, in endothelialen Zellen von Kapillaren und einigen Chondrozyten im Frakturkallus nach. Die Untersucher vermuteten eine Beteiligung von NGF an dem Heilungsprozess bei Frakturen. Der TrkA-Rezeptor wurde im Frakturkallus (Asaumi et al., 2000), sowie im Knorpel bei Mäuseembryonen (Mitsiadis et al., 1996) gefunden. Auch beim Menschen ist NGF im Knorpel vorhanden. Gigante et al. (2003) untersuchten normalen (nicht degenerativ veränderten)

fibrösen, hyalinen und elastischen Knorpel vom Kniegelenk, Kniemeniskus, Epiglottis und Bandscheibe bei Menschen postmortem auf NGF, NGF mRNA, TrkA und p75 hin. Im Kniegelenksknorpel waren NGF und beide Rezeptoren in allen Chondrozyten unabhängig vom Alter des Menschen und von der Gewebeschicht nachweisbar. Bei den Menisci waren NGF und seine Rezeptoren in Chondrozyt-ähnlichen Zellen, aber nicht in fusiformen Fibroblast-ähnlichen Zellen nachweisbar. Ebenso waren NGF und beide Rezeptoren in Chondrozyten-ähnlichen Zellen des Annulus fibrosus des Bandscheibengewebes und in Chondrozyten des elastischen Knorpels der Epiglottis vorhanden.

Bei der normalen lumbalen Bandscheibe von erwachsenen Menschen ist normalerweise nur das äußere Drittel des Annulus fibrosus innerviert (Jackson et al., 1966; Malinsky, 1959; Yoshizawa et al., 1980). Der restliche Teil des Annulus fibrosus und der Nucleus pulposus sind ohne Innervation und Gefäßversorgung. Freemont et al. stellten eine Verbindung zwischen dem Einsprossen von Nerven in degenerativ veränderte Bandscheiben und der Schmerzhaftigkeit bei den Patienten her (Freemont et al., 1997). Dabei handelte es sich um nicht-myelinisierte Schmerzfasern mit Substanz P als Neurotransmitter. Diese Fasern waren überwiegend von Blutgefäßen begleitet.

In einer weiteren Studie untersuchten Freemont et al. (2002) **41** lumbale Bandscheiben (22 L4/L5, 11 L5/S1 und 8 L3/L4) von **36** Patienten auf β -NGF und beide Rezeptoren hin. Das Bandscheibenmaterial wurde während der operativen anterioren Spondylodese erhalten. Dabei wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Gruppe A mit „schmerzhafter“ Bandscheibe und Gruppe B mit „nicht schmerzhafter“ Bandscheibe (je nachdem, ob bei der präoperativen Diskographie der Rückenschmerz/radikuläre Schmerz der Patienten auslösbar war, oder nicht). 21 Bandscheiben waren „schmerzhaft“ und Gruppe A, 20 waren Gruppe B und nicht „schmerzhaft“. 12 normale Bandscheiben von Verstorbenen dienten als Kontrollgruppe. β -NGF wurde in 18 der 21 „schmerzhaften“ Bandscheiben in microvaskulären Blutgefäßen im inneren Teil des Annulus fibrosus und im Nucleus pulposus nachgewiesen. Nur in den Fällen, in denen diese Gefäße auch von nicht-myelinisierten Nerven begleitet wurden, war NGF vaskulär nachweisbar und die Nervenfasern TrkA-positiv. Die Gruppe B und die Kontrollgruppe waren NGF-negativ. Der TrkA war in Chondrozyten von 9 Bandscheiben der Gruppe A, 5 der Gruppe B, aber nicht in der Kontrollgruppe nachgewiesen worden. Dabei handelte es sich um

Chondrozyten, die in Haufen (cluster) im Nucleus pulposus anzutreffen waren, was ein Zeichen des degenerativen Prozesses ist. Der p75-Rezeptor wurde nur im äußeren Drittel des Annulus fibrosus der beiden Gruppen, aber nicht in der Kontrollgruppe nachgewiesen.

Die Untersucher vermuten, dass NGF von den Blutgefäßen, die vom benachbarten Knochengewebe einsprossen, produziert wird. Dies wiederum ermöglicht das Einsprossen der Nervenfasern, was dann zur Schmerzhaftigkeit führt.

In einer Studie von Seidel et al. (2003) wurde die cerebrospinale Flüssigkeit von **18** Patienten mit Spinalnerven-Kompressionssyndromen wie Diskushernie, Spinalkanalstenose, Spondylolisthesis und Cauda-equina-Kompression auf die Konzentration von NGF hin untersucht. Im Vergleich dazu dienten 24 Patienten mit neurologischen Erkrankungen ohne mechanische Kompression des Spinalkanals (wie periphere Neuropathie und Multiple Sklerose). Die Ergebnisse zeigen, dass die axonale Schädigung bei Spinalnerven-Kompression mit erhöhten Spiegeln von NGF einhergeht. Diese vermehrte NGF-Produktion könnte somit zum Schmerz und zur Allodynie beitragen.

In einem Tiermodell zur Untersuchung der Ausschüttung von NGF und brain-derived neurotrophic factor (BDNF) bei lumbaler Diskushernie wurde von Obata et al. (2002) operativ bei Ratten eine Neuritis der Nervenwurzeln L4 und L5 links durch autologe Implantation eines coccygealen intervertebralen Diskus nach Hemilaminektomie der Etagen L4 und L5 erzeugt. Die Disci wurden auf die Nervenwurzeln implantiert ohne nennenswerte Kompression. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, bei denen ebenso eine Hemilaminektomie der gleichen Etagen und zusätzlich eine Entnahme der coccygealen Intervertebraldisci durchgeführt wurde, allerdings ohne Reimplantation. Die Tiere mit der autologen Transplantation entwickelten eine mechanische aber nicht thermische Hyperalgesie an der ipsilateralen Hinterpfote einen Tag nach OP, die 5 Tage danach erloschen war. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine deutlich höhere NGF-Immunreaktivität (NGF-IR) in der Nervenwurzel und im dorsalen Spinalganglion. Zusätzlich wurde zur genauen Kennzeichnung der NGF-positiven Zellen eine immunhistochemische Untersuchung mit ED-1 (erkennt Makrophagen und Monozyten) und Glial fibrillary acid protein (GFAP, Marker für Schwannsche Zellen) durchgeführt. Dabei war eine erhöhte NGF-IR bei den Tieren mit lumbaler Diskushernie in einer Vielzahl von nicht neuronalen Zellen festzustellen. Durch die Kolo-kal-isation mit ED-1 und GFAP konnten diese als Makrophagen und Schwannsche Zellen nachgewiesen werden. Allerdings gab es auch andere

Zellen mit NGF-IR ohne Kollokalisierung. Dies könnten Fibroblasten und glatte Muskelzellen sein. Es ist in vorhergehenden Studien gezeigt worden, dass Diskushernien-Gewebe *in vitro* und *in vivo* eine gesteigerte Produktion von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α verursachen (Kang et al., 1995; Takahashi et al., 1996). Da bekannt ist, dass IL-1 β und TNF- α die Produktion von NGF-mRNA in nicht neuronalen Zellen stimuliert (Hattori et al., 1993; Lindholm et al., 1987), könnten in diesem Modell diese Zytokine die Erhöhung des NGF in nicht neuronalen Zellen in der Nervenwurzel und dem Spinalganglion verursachen.

Zusätzlich war in diesem Tiermodell auch eine erhöhte Anzahl an BDNF-IR in den kleinen Neuronen des Spinalganglions 3 Tage nach Diskushernien Implantation nachweisbar. Mittels histochemischer *in situ* Hybridisation und reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) wurde auch die BDNF mRNA untersucht, die bei den Diskus-implantierten Tieren deutlich erhöht war. Es lag eine Zeitspanne zwischen der mRNA- und der BDNF-Protein-Produktion. Das impliziert, dass die erzeugte Neuritis erst zu der Erhöhung der BDNF-Synthese führte. Diese Synthese schien der vermehrten NGF-IR zu folgen. Das wiederum bedeutet, dass NGF - in den nicht neuronalen Zellen der Nervenwurzel und des Spinalganglions produziert – zu den Zellkörpern der Spinalganglien transportiert werden könnte und dort eine BDNF-Synthese forcieren könnte. In dieser Untersuchungsreihe wurde auch eine endoneurale Injektion von NGF in normale spinale Nervenwurzeln von Ratten durchgeführt, was dosis-abhängig zur mechanischen Allodynie der ipsilateralen Hinterpfote und zu gesteigerter BDNF-IR im Spinalganglion führte.

Diese Untersuchungsergebnisse bestärken den Verdacht, dass die Veränderungen beider Neutrophine in den primären Afferenzen bei der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen verursacht durch eine lumbale Diskushernie involviert sind. Zusätzlich lässt sich vermuten, dass hierbei NGF der treibende Faktor sein könnte.

4.15 Arthrose

Die Arthrose ist eine komplexe Veränderung, bei der biomechanische und metabolische Faktoren die Homöostase des artikulären Knorpels verändern. Eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie spielt die zelluläre/extrazelluläre Matrix, die durch Substanzen an der Zelloberfläche der Chondrozyten beeinflusst werden. Diese Substanzen modulieren die Zell/extrazelluläre Matrix (Zell/EZM) die wichtig für Wachstum, Differenzierung und Erhaltung der Knorpelhomöostase ist (Review siehe Iannone und Lapadula, 2003).

Zunächst wurde angenommen, dass Chondrozyten stoffwechselarm sind und nur passiv auf biochemische Reize hin zerstört werden, d.h. sich arthrotisch verändern. Im Laufe vieler Untersuchungen zeigte sich aber, dass die Chondrozyten einem reichhaltigen Metabolismus unterliegen. Während der Entstehung der Arthrose exprimieren sie vermehrt Substanzen, wie katabole Zytokine, Proteasen und Wachstumsfaktoren, die wiederum die Zell/EZM verändern mit der Konsequenz, dass ein Ungleichgewicht zwischen destruktiven und regulierenden Faktoren entsteht. Der Zusammenbruch des Gleichgewichtes der EZM ist vorwiegend einer Vielzahl von Metalloproteinasen und deren Inhibitoren zuzuschreiben. Beide sind kontrolliert von einer Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Die Chondrozyten produzieren Proteine (z. B. Kollagen) und Proteoglykane der EZM, die dann wiederum den Metabolismus der Chondrozyten reguliert. Welches auch immer die auslösende Noxe für die arthrotischen Vorgänge sein mag, das komplexe System der Matrix Metalloproteinasen (MMP) ist entscheidend an der Zerstörung des Knorpels beteiligt. Zu ihnen gehören die Kollagenase, Stromelysin, Gelatinasen und Matrilysin. Zum Beispiel haben intrartikuläre Injektionen von Kollagenase bei Hasen arthrose-ähnliche Veränderungen des Knorpels bewirkt (Kikuchi et al., 1998). Die biologische Aktivität dieser Matrix Metalloproteinasen (MMP) wird durch spezifische Gewebsinhibitoren kontrolliert und durch physiologische Aktivatoren, den Prometalloproteinasen in Gang gesetzt. Früher nahm man an, dass die MMPs nur von entzündeten synovialen Strukturen produziert wird und per diffusionem im Knorpel Schädigungen verursacht. Später zeigte sich, dass sogar in physiologischen Zuständen Chondrozyten MMPs und Gewebsinhibitoren produzieren und dass diese Balance wichtig für die EZM ist. Wenn nun die Homöostase durch proinflammatorische Zytokine etc. gestört wird, werden vermehrt MMPs gebildet, was in einer Schädigung des Knorpels resultiert.

Chondrozyten sind in ein komplexes System von prokatabolen, inhibierenden und reparierenden Mechanismen eingebunden.

Prokatabole Zytokine sind vor allem IL-1 β und TNF- α (van de Loo et al., 1995). Sie werden in entzündeter Synovia, in Chondrozyten und Osteoblasten gebildet und steigern die Synthese der MMPs sowie des Plasminogen-Aktivators. Sie steigern die Produktion von minderwertigem Kollagen und reduzieren die Synthese von Proteoglykanen, sowie des Kollagens, die beide das Stützgerüst des Knorpels sind. Weitere katabole Zytokine sind IL-6, LIF (leukaemia inhibitor factor) und IL-17. Folglich ist die Synovialmembran eine treibende Kraft für die Pathogenese der Arthrose.

Auf der anderen Seite stehen die Inhibitoren dieser Zytokine, von denen es drei Kategorien gibt: Antagonisten der Rezeptoren, lösliche Rezeptoren und antiinflammatorische Zytokine. Ein Vertreter der erstgenannten Kategorie ist der an der Zelloberfläche gebundene Rezeptor IL-1Ra. Der lösliche Rezeptor für TNF- α (TNF-sR) bindet extrazelluläres TNF- α und blockiert so seine biologische Aktivität. Die antiinflammatorischen Zytokine sind IL-4 und IL-10, die die Synthese der proinflammatorischen Zytokine herabsetzen und die Bildung des Antagonisten IL-1Ra steigern.

Wachstumsfaktoren regulieren die Differenzierung und das Wachstum des Gelenkknorpels. Ihre Wirkung scheint aber nicht nur auf Reparaturvorgänge in dem geschädigten Gewebe, durch katabole Faktoren induziert, zu sein. Bei der experimentell induzierten Arthrose nach vorderer Kreuzband-Durchtrennung bei Hunden (Adams und Brandt, 1991) war die Synthese von Komponenten der EZM schon in sehr frühen Stadien -wahrscheinlich durch die exzessive Produktion an Wachstumsfaktoren- gesteigert. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören IGF (insulin-like growth factor), TGF β (transforming growth factor β), BMP (bone morphogenetic protein) und CDMP (cartilage-derived morphogenetic protein).

NGF wirkt dabei als Verbindung zwischen den Mediatoren der Entzündung, dem Immunsystem und den Neuropeptiden, wie zum Beispiel Substanz P, die bei der Arthrose auch vermehrt sezerniert wird. Die menschlichen Chondrozyten sezernieren NGF und seinen TrkA-Rezeptor (Iannone et al., 2002) bei der Arthrose in vermehrter Menge und zwar proportional zu dem Grad der Schädigung des Knorpels. Ob die gesteigerte Sekretion nur den Reparaturvorgängen dient, oder auch andere Funktionen ausübt, ist noch unklar.

Aloe et al. (1992a) untersuchten bei 6 Patienten mit Gonarthrose NGF in der Synovialflüssigkeit. Die NGF-Spiegel der Arthrose-Patienten waren im Vergleich zu Gewebeproben Gesunder erhöht, aber im Vergleich zu diversen entzündlich-rheumatischen Erkrankungen mit hoher entzündlicher Aktivität deutlich niedriger. Auch waren in der Synovia histopathologisch keine Entzündungszeichen und immunohistochemisch keine NGF-positiven Zellen nachgewiesen worden (was in der Synovia eines c.P.-Patienten der Fall war). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Höhe des NGF-Spiegels mit der entzündlichen Aktivität im Gewebe korreliert.

Manni et al. (2003) untersuchten bei 3 Coxarthrose-Patienten die NGF-Konzentrationen in den isolierten synovialen Fibroblasten. Zum Vergleich dienten 5 gesunde Probanden. Die Untersucher

isolierten in beiden Gruppen die synovialen Fibroblasten und kultivierten sie. NGF-Protein wurde mittels two-site ELISA im Kulturmedium und die NGF-mRNA mittels RT-PCR-ELISA in den synovialen Fibroblasten gemessen. Dabei fanden sich im Kulturmedium der Arthrosegruppe drei Mal höhere NGF-Werte als bei der Kontrollgruppe. Nach Zugabe von IL-1 β ins Kulturmedium stieg bei den arthrotischen Zellen sowohl die NGF Expression ins Kulturmedium, als auch die NGF-mRNA in den Zellen erheblich an. Die Zugabe von TNF- α steigerte ebenso die NGF-Proteinexpression ins Medium, aber in geringerem Maße als IL-1 β , und hatte keinen Einfluß auf die NGF-mRNA. Der TrkA-Rezeptor wurde in den synovialen Zellen sowohl in der Arthrose-, als auch in der Kontrollgruppe nachgewiesen, wobei die Zellen der Arthrosegruppe vermehrt den Rezeptor aufwiesen. Die Zugabe der proinflammatorischen Zytokine erhöhte nicht die Rezeptorexpression.

Zusammenfassend produzieren und exprimieren synoviale Fibroblasten aus arthrotisch veränderten Gelenken vermehrt NGF sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach der Stimulierung durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α .

In einer Untersuchungsreihe von Iannone et al. (2002) wurde die NGF-Konzentration und die Häufigkeit des TrkA-Rezeptors in Chondrozyten von Gesunden und Patienten mit Gonarthrose bei Genu varum untersucht. Dabei wurde der Knorpel bei den Arthrose-Patienten in zwei Zonen unterteilt: in eine mit makroskopisch und histologisch gering veränderte und in eine maximal veränderte Zone (MIN und MAX). 12 Patienten hatten eine Gonarthrose, 3 Patienten dienten als Kontrollgruppe. NGF- β mRNA wurde mittels RT-PCR (reverse transcriptase-Polymerase chain reaction) ermittelt. Zusätzlich wurden NGF- β und TrkA mit der Immunofluoreszenzmethode und Durchflusszytometrie untersucht. Die normalen Chondrozyten hatten nachweisbare NGF- β mRNA-Konzentrationen und eine geringe Anzahl an TrkA-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die Menge an Rezeptoren, an intrazellulärem NGF und die NGF- β mRNA waren in der MIN-Zone der Arthrose-Patienten deutlich erhöht und nochmals höher in der MAX-Zone. Folglich korrelierte der Grad der Knorpelschädigung mit der Menge an NGF und seinem Rezeptor, sodass für NGF eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Arthrose angenommen werden muss.

4.16 Natürliche anti-NGF Autoantikörper bei autoimmunen Erkrankungen

Dicou et al. (1991) wiesen im Serum beim Menschen und beim Hasen natürliche anti-NGF Autoantikörper nach. Ihre Funktion ist nicht ganz verstanden. Wahrscheinlich fungieren sie als Transportproteine für NGF. Die Untersucher zeigten mit ELISA-Technik unter Benutzung von immobilisiertem NGF, durch Immunopräzipitation mit gereinigtem Maus-NGF (Dicou et al., 1991; Dicou et al., 1996) und durch die Inhibition der biologischen NGF-Wirksamkeit an sensorischen Ganglien bei Hühnerembryonen (Dicou et al., 1993a; Dicou et al., 1996), dass diese Antikörper spezifisch für NGF sind. Die NGF-Autoantikörper enthielten allen Ig-Klassen, wobei IgG überwog (Dicou et al., 1993a). Signifikant höhere Titer der NGF-Autoantikörper konnten bei Patienten mit SLE, RA und Autoimmunthyreoiditis nachgewiesen werden (Dicou et al., 1993b). In der Studie von Dicou et al. (1996) wurden deutlich erhöhte NGF-Autoantikörper bei mehreren autoimmunen Erkrankungen sowohl im Serum, als auch in der synovialen Flüssigkeit nachgewiesen. An dieser Studie nahmen Patienten mit RA, Spondarthritiden, Kristallarthropathie (Chondrokalzinose) und Arthrose teil. Die höchsten Autoantikörpertiter in der synovialen Flüssigkeit bestanden bei der Spondarthritis, gefolgt von der RA-Gruppe und waren in der synovialen Flüssigkeit bei der Chondrokalzinose und Arthrose am niedrigsten. Im Serum gemessene Autoantikörper waren bei der RA-Gruppe am höchsten, gefolgt von der Spondarthritis-Gruppe und wieder am niedrigsten bei der Chondrokalzinose und Arthrose, aber dennoch höher, als in der Kontrollgruppe. Dies spricht dafür, dass auch bei den letzt genannten Erkrankungsformen entzündliche Prozesse durch den Anstieg der Autoantikörper als sensitiven Marker nachgewiesen werden könnten. In derselben Studie wurden auch die NGF-Konzentrationen im Serum und in der synovialen Flüssigkeit bei allen Erkrankungsgruppen gemessen. Dabei war die Frequenz des nachweisbaren NGF bei der RA sowohl im Serum, als auch in der synovialen Flüssigkeit signifikant erhöht, bei der Spondarthritis nur in der synovialen Flüssigkeit, während bei der Chondrokalzinose weder im Serum, noch in der synovialen Flüssigkeit eine erhöhte Frequenz nachweisbar war. Die Analyse der Ergebnisse konnte kein reziprokes Verhältnis zwischen Autoantikörper- und NGF-Titer aufzeigen. Die Antikörper könnten zum Transport des zirkulierenden NGF oder aber auch zur Inhibition der NGF-Wirkung dienen (Dicou et al., 1993a). Von den NGF-Autoantikörpern in autoimmunen Erkrankungen wurde gezeigt, dass sie im Vergleich zur normalen Kontrollgruppe eine höhere Affinität zu NGF haben und eine höhere Polyreaktivität mit zytoskeletalen Proteinen und DNA aufweisen (Dicou

et al., 1993a). Die Bedeutung des simultanen Auftretens von NGF und NGF-Autoantikörpern in Körperflüssigkeiten ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Dieses Phänomen erinnert an die Rheumafaktoren, die ebenfalls Autoantikörper gegen IgG darstellen.

Tab. 2. Übersicht der Untersuchungsreihen zu NGF und seinen Rezeptoren bei entzündlich-rheumatischen und degenerativen Erkrankungen

Erkrankung	Messverfahren	untersuchtes Gewebe	Anzahl der Patienten	Anzahl der Kontrollprobanden	NGF/Rezeptor bei Erkrankten	NGF/Rezeptor bei Kontrollgruppe	Quelle
Rheumatoide Arthritis	Bioassay	SF Knie	8	2	NGF 0-9 ng/ml	nicht nachweisbar	Aloe et al. (1992a)
	ELISA	Serum	24	108	NGF 74.8±39.6 pg/ml	NGF 26.50±15.4 pg/ml	Dicou et al. (1993b)
		SF Knie	22	8 mit Arthrose	NGF 78.8±25.3 pg/ml	NGF 5.0±4.0 pg/ml	Aloe et al. (1999)
			13	5	NGF 523.5±123.8 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
	Immuno-histochemisch	Synovia von Knie-, Hand- und Hüftgelenk	15	14 posttraumatisch, nicht entzündlich	TrkA vermehrt nachgewiesen		Pozza et al. (2000)
Juvenile chronische Arthritis	Bioassay	SF Knie	1	2	NGF 12 ng/ml	nicht nachweisbar	Aloe et al. (1992a)
	ELISA	Serum	80	40	NGF 254 pg/ml	NGF 6 pg/ml	Falcini et al. (1996b)
Psoriasis	ELISA	Haut	19 Psoriasisplaques	11	NGF 77.1±6.7 pg/g Gewebe	NGF 47±4.6 pg/g Gewebe	Fantini et al. (1995)
			20 nicht erkrankte Psoriasishaut	11	NGF 59.6±4.7 pg/g Gewebe	NGF 47±4.6 pg/g Gewebe	
			23 mit Pruritus	15 ohne Pruritus	NGF 154.33±34.1 pg/g Gewebe	NGF 96.84±25.7 pg/g Gewebe	Nakamura et al. (2003)
	Immuno-histochemisch	Haut	8 Psoriasisplaques	5 Gesunde	NGF-positive Keratinozyten/mm ² 84.7±46.3	NGF-positive Keratinozyten/mm ² 18.9±11.8	Raychaudhuri et al. (1998)
			8 nicht erkrankte Psoriasishaut	5 Lichen Planus	NGF-positive Keratinozyten/mm ² 44.8±29.9	NGF-positive Keratinozyten/mm ² 7.5 ±16.9	
			26 Psoriasisplaques	8 Gesunde	p75-positives Nervengewebe/3mm Biopsie 34.0±23.0	p75-positives Nervengewebe/3mm Biopsie 18.88±11.76	Raychaudhuri et al. (2000b)
			8 nicht erkrankte Psoriasishaut	12 entzündliche Dermatosen	p75-positives Nervengewebe/3mm Biopsie 28.10±4.5	p75-positives Nervengewebe/3mm Biopsie 12.75±22.0	

Erkrankung	Messverfahren	untersuchtes Gewebe	Anzahl der Patienten	Anzahl der Kontrollprobanden	NGF/Rezeptor bei Erkrankten	NGF/Rezeptor bei Kontrollgruppe	Quelle
Psoriasisarthritis	Bioassay	SF Knie	4	2	NGF 2-12 ng/ml	nicht nachweisbar	Aloe et al. (1992a)
Morbus Reiter	ELISA	SF Knie	2	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
Chondrokalzinose	ELISA	SF Knie	3	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
Spondylitis ankylosans	Bioassay	SF Knie	3	2	NGF 4-6 ng/ml	nicht nachweisbar	Aloe et al. (1992a)
	ELISA	SF Knie	1	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
HLA B27 assoziierte Arthritis	ELISA	SF Knie	3	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
Infektiöse Arthritis	ELISA	SF Knie	2	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
Sklerodermie	ELISA	SF Knie	1	5	NGF 430.0±90 pg/ml	NGF 95±33.2 pg/ml	Halliday et al. (1998)
		Serum	44	40	NGF 61.3 ng/ml	NGF 8.3 ng/ml	Matucci-Cerinic et al. (2001)
			davon 13 Patienten mit Gelenkbefall	40	NGF 117 ng/ml	NGF 8.3 ng/ml	
	Immuno-histochemisch	Haut	7	2	vermehrter NGF Nachweis in der Dermis		Piga et al. (2000)
			8	2	vermehrter NGF Nachweis in der Dermis		Tuveri et al. [43]
Systemischer Lupus Erythematodes	ELISA	Serum	27	108	NGF 69.25±36.4 pg/ml	NGF 26.50±15.4 pg/ml	Dicou et al. (1993b)
			10	25 mit Oligo/Polyarthritis, orthopädische Probleme, Juvenile Polyarthritis	NGF 3346±2628 pg/ml	NGF 471±352 pg/ml	Aalto et al. (2002)
			16	15	NGF 17.1±1.7 pg/ml	NGF 5.5±1.15 pg/ml	Bracci-Laudiero et al. (1993)
Kawasaki Syndrom	ELISA	Serum	12	12	NGF 1219±1660.29 pg/ml	NGF 6.5±2.03 pg/ml	Falcini et al. (1996a)

Erkrankung	Messverfahren	untersuchtes Gewebe	Anzahl der Patienten	Anzahl der Kontrollprobanden	NGF/Rezeptor bei Erkrankten	NGF/Rezeptor bei Kontrollgruppe	Quelle	
Vaskulitiden	RT-PCR	Biopsie des N. suralis	12 Churg-Strauss-Syndrom 10 Panarteriitis nodosa	7	NGF mRNA 0.29±0.07	NGF mRNA 0.13±0.03	Yamamoto et al. (2001)	
Arteriitis temporalis	Immuno-histochemisch	Biopsie der A. temporalis	7 entzündlich veränderte Biopsien	10 nicht entzündlich veränderte Biopsien von Kopfschmerzpatienten	TrkA in beiden Gruppen unverändert nachweisbar		Saldanha et al. (1999)	
Morbus Behçet	ELISA	Serum	10	10	NGF 37.0±34.75 pg/ml	NGF 98.4±83.4 pg/ml	Accorinti et al. (2003)	
			27	27	NGF 289% der Kontrolle	NGF 18.3±2.8 pg/ml	Jockers-Scherübl et al. (1996)	
Fibromyalgie	ELISA	CSF	34 mit primärer Fibromyalgie	35	NGF 41.8±12.7 pg/ml	NGF 9.1±4.1 pg/ml	Giovengo et al. (1999)	
			15 mit sekundärer Fibromyalgie	35	NGF 8.9±4.4 pg/ml	NGF 9.1±4.1 pg/ml		
			10 mit anderen Schmerzzuständen	35	NGF 16.3±8.4 pg/ml	NGF 9.1±4.1 pg/ml		
Spinale Nervenkompressionssyndrome	ELISA	CSF	18	24	NGF 332.68±159.8 pg/ml	NGF 209.6±72.12 pg/ml	Seidel et al. (2003)	
Gonarthrose	Bioassay	SF Knie	6	2	NGF 0-6 ng/ml	nicht nachweisbar	Aloe et al. (1992a)	
	RT-PCR	Kniegelenksknorpel	2	2	NGF mRNA in erkrankter und nicht erkrankter Gruppe ähnlich nachweisbar		Iannone et al. (2002)	
	Immuno-histochemisch	Kniegelenksknorpel	12 unterteilt in 2 Gruppen:					Iannone et al. (2002)
			MIN (geringe arthrot. Veränderung)	3	NGF-positive Chondrozyten 21.3±12 %	NGF-positive Chondrozyten 3.8±2.4 %		
					TrkA-positive Chondrozyten 31±11 %	TrkA-positive Chondrozyten 3.4±1 %		
			MAX (starke arthrot. Veränderung)	3	NGF-positive Chondrozyten 41.3±25 %	NGF-positive Chondrozyten 3.8±2.4 %		
TrkA-positive Chondrozyten 41.4±19 %	TrkA-positive Chondrozyten 3.4±1 %							

5 Diskussion

NGF hat eine zentrale Bedeutung in der Neurobiologie. Er reguliert das Überleben und die Differenzierung von NGF-sensitiven Neuronen während der Embryonalzeit und in der frühen postnatalen Phase. Während derselben Phase, aber auch in späteren Stadien, wird eine Vielzahl anderer Entwicklungsprozesse wie das Wachstum von Neuriten (Axone und Dendriten) und die Expression von Enzymen zur Produktion von Neurotransmittern reguliert. NGF fördert und kontrolliert die Funktion differenzierter Neurone. Dieses Neurotrophin wird in Entfernung der Zellkörper durch periphere Gewebe oder andere Neurone synthetisiert, die mit den Axonen von NGF-sensitiven Neuronen in Kontakt stehen. Nach retrogradem Transport erreicht NGF die Zellkerne, wo eine Vielzahl von Genen aktiviert werden. Die meisten Untersucher sehen die Funktion von NGF als Anpassung innervierender Neurone auf die Bedürfnisse der Zielgewebe durch Zunahme der Anzahl, der Aussprossung und gesteigerte Funktion (Oppenheim, 1991). NGF ist nicht nur für die Entwicklung und Erhaltung der sensitiven Neurone wichtig, sondern auch in neurobiochemische Prozesse bei entzündlich und degenerativ veränderten Geweben involviert.

Signifikant erhöhte NGF-Konzentrationen wurden in vielen entzündlichen Geweben (wie in dieser Metaanalyse zusammengestellt) gefunden: unter anderem in der Haut von Psoriasis- und Sklerodermie-Patienten, in entzündlichen Exsudaten (Synovialflüssigkeit von Kniegelenken) bei Rheumatoider Arthritis, Spondarthritiden mit peripherer Gelenkbeteiligung, Morbus Reiter und Chondrokalzinose, im Serum bei juveniler chron. Polyarthritis, systemischem Lupus erythematodes und in der cerebrospinalen Flüssigkeit bei Fibromyalgie und spinaler Kompression verschiedener Ursachen (siehe Tabelle). NGF scheint an der Entzündungskaskade direkt über die modulierende Wirkung auf Zellen des Immunsystems (Aloe et al., 1997) und indirekt über die steigernde Wirkung auf die Neuropeptid-Synthese (Amann et al., 1996; Edwards et al., 1988b; Lindsay und Harmer, 1989), einschließlich SP und CGRP, mitzuwirken. Die Neuropeptide wirken dann wiederum auch auf Zellen des Immunsystems. Eine Vielzahl an Untersuchungsreihen zeigt, dass diese Neuropeptide in die Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen involviert sind (Levine et al., 1984). Zum Beispiel sind SP- und CGRP-Konzentrationen in der synovialen Flüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und anderen entzündlichen Erkrankungen deutlich gesteigert (Larsson et al., 1989; Larsson et al., 1991; Marshall et al., 1990). Auch in Tiermodellen mit experimentell induzierter Arthritis

wurden erhöhte Neuropeptid-Konzentrationen nachgewiesen (Bileviciute et al., 1993; Garry und Hargreaves, 1992; Kuraishi et al., 1989). Die Involvierung des peripheren Nervensystems in lokale, entzündliche Prozesse wird durch Untersuchungen mit chemischer Denervierung (chemische Sympathektomie) bestätigt. Die Entzündungsprozesse und die Neuropeptid-Konzentrationen werden durch diese Denervierung deutlich reduziert (Cruwys et al., 1995; Levine et al., 1986).

Diese Beobachtungen legen eine potentielle therapeutische Strategie in der Behandlung von entzündlichen Gelenkserkrankungen mit Abschwächung oder gar Unterbrechung der durch NGF verursachten Entzündungskaskade am Ort des Entzündungsgeschehens nahe.

Dabei eröffnen sich mehrere Ansätze: die Entwicklung von Antikörpern, die das endogene NGF abfangen, oder Substanzen, die sogar die Produktion von NGF unterbinden, oder Antagonisten, die den Rezeptor von NGF blockieren. Dieses würde eine neue Klasse von antiinflammatorischen und analgetischen Medikamenten hervorbringen.

Verschiedene Versuchsreihen mit unterschiedlichen Antagonisten (siehe Kapitel 2.6) dienen zum einen dem besseren Verständnis der Wirkmechanismen von NGF, zum anderen zur Entwicklung potentieller therapeutischer Strategien. Dabei wurde sowohl die Wirkung verschiedener Antagonisten auf das periphere und zentrale Nervensystem, als auch auf ihre Wirkung in entzündlich veränderten peripheren Geweben untersucht. Zum Beispiel verminderten neutralisierende anti-NGF-Antikörper die Hyperalgesie, die entzündlich bedingt vermehrte SP- und CGRP-Synthese und die durch Entzündung induzierte c-fos Gen-Expression in den Dorsalganglien (Lewin et al., 1994; Woolf et al., 1994; Woolf und Doubell, 1994). Ein entwickeltes TrkA-IgG-Fusionsmolekül, das endogenes NGF sequestriert, konnte bei der durch Carrageenan induzierten Entzündung die thermische und chemische Hyperalgesie erheblich reduzieren (McMahon et al., 1995). Auch zeigte der NGF-Rezeptor Antagonist ALE-0540 in Modellen mit neuropathischen Schmerzen (durch die Ligatur von Nerven) und in Modellen mit entzündungsbedingten Schmerzen (durch Hitze induziert) einen signifikanten analgetischen Effekt (Owolabi et al., 1999). Dabei schien die Wirkung des ALE-0540 über spinale und nicht zentrale Mechanismen zu laufen, denn eine intracerebroventrikuläre Applikation milderte die Allodynie nicht. Dies würde bedeuten, dass beim therapeutischen Einsatz dieses Antagonisten keine zentralen Nebenwirkungen, wie zum Beispiel bei Morphinen, auftreten würden. Ob eine lang anhaltende Therapie mit Antagonisten gegen NGF oder seinen Rezeptor, was bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wahrscheinlich notwendig wäre, auch so weit reichende

Folgen hätte wie bei den genetisch veränderten Knock-out-Mäusen, ist offen. Bei den homozygoten Formen mit NGF (-/-) oder TrkA (-/-) knockout sind dramatische Phänotypen entstanden (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994), die postnatal nicht an Gewicht zunahmten und meist in den ersten Lebenswochen verstarben, sodass eine intensivere Forschung nicht möglich ist. Beide homozygoten Formen haben einen dramatischen Verlust der Anzahl dorsaler Ganglien (70%-80%), der superioren Zervikalganglien (99%) und der Trigeminalganglien (70%). Schon bei der Geburt schienen nahezu alle Neurone der Dorsalganglien untergegangen zu sein (Crowley et al., 1994; Smeyne et al., 1994), während viele sympathische Ganglienneurone bis zur postnatalen Phase überleben, aber dann rasch einem massiven neuronalen Zelltod unterlagen. Zehn Tage später waren die sympathischen Ganglien nahezu vollständig degeneriert. Es gibt also unterschiedliche Zeitperioden in denen die verschiedenen neuronalen Populationen eine NGF-Abhängigkeit aufweisen. Eine anti-NGF-Therapie in der ausgereiften, adulten Phase hätte wahrscheinlich keine so schwerwiegenden Folgen, wie bei den schon in der embryonalen Phase gestörten Tieren. Bei den homozygoten Tieren war der Verlust der Neurone im Dorsalganglion selektiv und betraf vorwiegend kleine, peptidhaltige primär nociceptive Neurone. Dagegen waren großkalibrige Neurone im Dorsalganglion, die Rezeptoren für andere Neurotrophine tragen (TrkB und TrkC), bis zum Tod der Tiere erhalten und funktionstüchtig. Die untergehenden sensorischen, nociceptiven Neurone in den Knock-out Tieren bestätigt die Meinung, dass diese Neurone NGF während der Entwicklung benötigen. Die heterozygoten Tiere (NGF +/- und TrkA +/-) leben länger und zeigen erhöhte Latenzzeiten auf schmerzhafte Stimuli (Crowley et al., 1994). Und umgekehrt entwickeln transgene Tiere mit einer Überexpression von NGF auf noxische mechanische Stimuli eine gesteigerte Hyperalgesie (Davis et al., 1993). NGF reguliert anscheinend das Überleben der nociceptiven, peptidhaltigen Neurone während der Entwicklungsphase und in späteren, ausgereiften Phasen ihre Funktion. Somit könnte das Vermögen über erniedrigte NGF-Spiegel, oder erniedrigte Signaltransduktion des Rezeptors eine viel versprechende therapeutische Anwendung finden, zum Beispiel durch die schon erwähnten Antagonisten. Wenn diese Antagonisten als große Moleküle konzipiert werden würden, sodass sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden könnten, wären unerwünschte zentrale Nebenwirkungen damit eher ausgeschlossen. Ob die Therapie mit Antagonisten nicht nur analgetische, sondern auch antiinflammatorische Wirkung zeigt, ist noch nicht eindeutig zu beantworten.

Trotz der vielen Untersuchungsergebnisse, die bei rheumatischen /autoimmunen Erkrankungen eine deutliche Erhöhung der NGF-Konzentrationen zeigen, ist aber dennoch unklar, inwieweit NGF ein Ergebnis oder ein Förderer – direkt oder indirekt – für die pathophysiologischen Zusammenhänge ist. Die erhöhte Ausschüttung von NGF ist nicht nur mit Entzündung und Hyperalgesie verbunden (Woolf et al., 1994). NGF ist auch wichtig für Nervenwachstum und Reparationsvorgänge von Schädigungen (Aloe et al., 1992b; Aloe et al., 1994a), auch solchen wie sie z.B. bei Nervenverletzungen, oder auch bei Arthritis entstehen. Die Autoren Manni und Aloe (Manni und Aloe, 1998) mutmaßen zwei Seiten von NGF: eine hilfreiche und eine schädliche, die beide bei der Entstehung der Arthritis eine Rolle spielen. Die erhöhten NGF-Konzentrationen könnten in der akuten Phase der Arthritis der Prävention oder Reduktion von Schädigungen, die durch zytotoxische Moleküle (zum Beispiel Zytokine) im Gelenk verursacht werden, dienen. Die arthritischen Prozesse verursachen z.B. einen partiellen Verlust an sympathischen und sensorischen Nervenfasern im geschädigten Gelenk (Woolf et al., 1994). Also könnten die erhöhten NGF-Spiegel Ausdruck von reparativen Vorgängen sein. Die lokale Schädigung der peripheren Nervenendigungen durch arthritische Prozesse und die Reinnervationsmechanismen nach Arthritis wurde bei Ratten beobachtet (da Silva et al., 1996). Auch die Regulierung der Proliferation und Aktivierung von immunkompetenten Zellen könnte in diesem Kontext gesehen werden. Die Tatsache, dass die Injektion von NGF in Kniegelenke ausgewachsener Mäuse keine lokale Entzündung hervorrief (Aloe et al., 1992b), bestärkt die Hypothese, dass NGF eher antiinflammatorisch wirksam ist.

Allerdings ist auch eine „schädliche“ Seite des NGF anzunehmen, bei der die erhöhten NGF-Konzentrationen durch Bindung an den TrkA-Rezeptor der sensorischen peripheren Nociceptoren Hyperalgesie auslösen und durch erhöhte Ausschüttung von Neuropeptiden die Entzündungskaskade mit der Folge der neurogenen Entzündung (Donnerer et al., 1992) weiter unterhalten können.

Viele in vitro und in vivo Studien haben gezeigt, dass NGF in die Prozesse entzündlicher Veränderungen involviert ist. Basale NGF-Spiegel sind signifikant erhöht in Zellen, die mit IL-1 β und TNF- α , zwei proinflammatorische Zytokine, behandelt werden (Hattori et al., 1993; Lindholm et al., 1987). Synoviale Zellen und Flüssigkeiten bei arthritischen Prozessen beim Menschen und in Tiermodellen zeigen erhöhte NGF-Werte (Aloe et al., 1992a; Aloe et al., 1992b). Sie zeigen aber auch immer einen lokalen Anstieg an proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere IL-1 β und TNF- α (Brennan et al., 1998). Von diesen Zytokinen ist bekannt, dass sie

die Expression von NGF regulieren, unter anderem auch in synovialen Zellen, wo sowohl das NGF-Protein vermehrt ausgeschüttet wird, als auch die NGF-mRNA in den synovialen Zellen unter Zytokineinfluss vermehrt gebildet wird (Manni et al., 2003). Ob die vermehrte lokale NGF-Synthese und -Ausschüttung durch die entzündlich erhöhten Zytokine einen regenerativen Mechanismus darstellt, ist denkbar. Aber die erhöhte Synthese von NGF bewirkt eine vermehrte Expression von Neurotransmittern (siehe Kapitel Neuropeptide und neurogene Entzündung), die dann wiederum zur neurogenen Entzündung führt. Die neurogene Entzündung und NGF haben zum Beispiel bei der Psoriasis große Bedeutung (Raychaudhuri und Raychaudhuri, 2004). Die Anwendung sowohl des TrkA-Rezeptor-Blockers K-252a, als auch NGF-neutralisierender Antikörper bei SCID-Mäusen (ein Tiermodell für Psoriasis) zeigte eine deutliche Besserung der Psoriasis nach nur 2 Wochen Therapie (Raychaudhuri et al., 2004). Dies spricht für eine proinflammatorische Wirkung von NGF.

Außerdem spricht auch die Wirkung von NGF auf immunkompetente Zellen für den proinflammatorischen Einfluss. NGF bewirkt zum Beispiel bei Mastzellen die Degranulierung und damit die Histaminfreisetzung (Horigome et al., 1993; Mazurek et al., 1986). Histamin wiederum steigert z.B. in menschlichen Keratinozyten, wahrscheinlich über die c-Fos-Aktivierung, die vermehrte Aktivität des NGF-Promotors mit erhöhter Produktion und Sekretion von NGF in Keratinozyten (Kanda und Watanabe, 2003). Die dadurch erhöhte NGF-Menge wiederum wirkt auf weitere Mastzellen mit weiterer Degranulierung und Histaminfreisetzung. So entsteht eine positive Feed-back-Schleife, die dann in sensorischen Neuronen die vermehrte Synthese immunmodulatorischer Neuropeptide wie SP und CGRP (Lindsay und Harmer, 1989) bewirkt. Zu dem kann NGF auch die vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Raychaudhuri et al., 2000a) in Keratinozyten und eine gesteigerte Differenzierung von Neutrophilen und T-Zellen (Toyoda et al., 2002) bewirken. So würde der entzündliche Prozess bei Hauterkrankungen wie die Psoriasis sich manifestieren und exazerbieren.

Ähnliche entzündliche Prozesse sind bei anderen rheumatischen Erkrankungen denkbar, so dass eher eine anti-NGF-Therapie bei diesen Erkrankungen notwendig erscheint. In diesem Falle wäre die Entwicklung von antagonistisch wirkenden Stoffen notwendig, um die Entzündungskaskade zu unterbrechen. Neben synthetisch hergestellten Antagonisten, wären auch körpereigene Substanzen wie das Neurotrophin NT-3 denkbar. NT-3 bindet zwar bevorzugt an den TrkC-Rezeptor, aber auch an TrkB und TrkA (Belliveau et al., 1997; Cordon-Cardo et al., 1991;

Mischel et al., 2001). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass NT-3 einige TrkA-Mechanismen in nociceptiven Neuronen der dorsalen Wurzelganglien antagonisieren kann (Jongsma Wallin et al., 2001; Karchewski et al., 2002). Gratto und Verge (2003) wiesen nach, dass NT-3-Infusionen bei adulten Ratten in den TrkA-positiven/ TrkC-negativen nociceptiven Neuronen die Expression der TrkA mRNA, die Bindung von NGF an den Rezeptor und die Menge an SP mRNA, sowie SP-Protein deutlich reduzierten. Diese Ergebnisse lassen auf eine potentielle therapeutische Anwendung von NT-3 als NGF-Antagonist schließen.

Bei Erkrankungen neuraler Strukturen wie z.B. neurodegenerative Erkrankungen und Polyneuropathien sind Versuche unternommen worden, die regenerierende Wirkung von NGF therapeutisch zu nutzen.

Bei der diabetischen peripheren Polyneuropathie (PNP) gibt es Hinweise darauf, dass die Konzentration von NGF vermindert ist und dass dieser Mangel zur Entstehung der Neuropathie beiträgt (Hellweg und Hartung, 1990; Hellweg et al., 1994; Jakobsen et al., 1981). Durch die Substitution von rhNGF (rekombiniertes humanes NGF) erhofft man sich, die PNP zu bessern oder gar zu verhindern. In vitro und im Tierversuch in vivo angewendetes NGF hatte günstige Effekte gezeigt (Apfel et al., 1994). In einer großen randomisierten Doppelblind-Studie (Apfel et al., 2000) wurden bei Diabetes-Patienten 48 Wochen lang rhNGF mittels s.c. Injektionen angewendet. Dabei erbrachte die NGF-Applikation leider keinen statistisch signifikanten Effekt. Dies kann mit der Dosierung von NGF zusammenhängen, denn bei den vorausgegangen Tierversuchen wurden deutlich höhere Konzentrationen angewendet. Außerdem war einer der Verlaufsparameter die distale Nervenleitgeschwindigkeit, die eher eine Aussage über großkalibrige Nervenfasern macht. NGF aber wirkt auf die kleinkalibrigen, sensorischen Neuropeptid-haltigen Fasern. Zudem zeigt sich Nervenregeneration zuerst in proximalen Nervenabschnitten, sodass die gemessenen peripheren Latenzzeiten keine genaue Aussage in frühen Therapiestadien machen kann (Quasthoff und Hartung, 2001). Diese Ergebnisse schließen NGF als Therapiemöglichkeit noch nicht aus.

Bei der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer unterliegen die cholinergen Projektionen vom basalen Vorderhirn zu Hippocampus und Cortex cerebri degenerativen Veränderungen. Von diesen Projektionen wird angenommen, dass sie für kognitives Vermögen und Gedächtnis wichtig sind. Bei Alzheimer-Patienten exprimieren die cholinergen Neurone noch NGF-Rezeptoren (Kordower et al., 1989). In Tierversuchen zeigte sich, dass Schädigungen

der cholinergen Neurone mit einer Störung kognitiver Fähigkeiten einhergeht und durch die Behandlung mit NGF gemildert werden kann (Fisher et al., 1987; Hefti et al., 1989). Bei einer klinischen Studie mit drei Alzheimer-Patienten war aber nach intracerebroventrikulärer Gabe von NGF über drei Monate hinweg keine signifikante Besserung des kognitiven Vermögens zu beobachten (Eriksdotter Jönhagen et al., 1998). Die Erklärung dafür bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

In klinischen Studien wurde als erster Wachstumsfaktor NGF mittels intraputaminale Infusionen bei Morbus Parkinson angewendet, was einen positiven Langzeit-Effekt zu haben scheint (Olson et al., 1991; Sydow et al., 1995).

Bei Tiermodellen mit experimenteller Demenz (erzeugt durch intraseptale Infusionen von monoklonalen anti-NGF Antikörpern) konnte nach einer vermehrten Expression von NGF eine deutliche Besserung des Lernverhaltens und der ChAT-Aktivität erzielen (Nitta et al., 1997). Dabei wurde die gesteigerte endogene NGF-Produktion mit Hilfe des oral applizierten Wirkstoffes Propentofyllin erreicht. Propentofyllin ist ein Xanthinderivat, von dem eine starke Stimulierung der NGF-Synthese und -Sekretion in Astrozyten bei der Maus *in vitro* nachgewiesen wurde. Der Einsatz von NGF Stimulatoren könnte einen neuen Ansatzpunkt bei der medikamentösen Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen bieten.

Der regenerative Effekt von NGF wurde auch schon durch topische Anwendung beim Menschen zur Behandlung von Korneal- und Hautulcera verschiedener Ursachen erfolgreich ausgenutzt (Aloe, 2004). Da NGF, wie schon dargestellt, von Fibroblasten/Myofibroblasten, Epithelzellen, Keratinozyten und Zellen des Immunsystems exprimiert wird und peripher sensorische und sympathische Nerven die Fähigkeit haben, auf NGF-Stimuli zu reagieren, wirkt NGF über autokrine/parakrine Mechanismen an der Reepithelisierung der Haut mit, wahrscheinlich am meisten über die Formation von kleinen Blutgefäßen sowie Reinnervation und trägt so zur Wundheilung bei.

Bei Patienten mit Kornealulcera und Skleritis heilten die Ulcera nach topischer Anwendung von NGF nach 2 Wochen und die Entzündung nach 3 Wochen ab (Lambiase et al., 1998a; Lambiase et al., 1998b). Auch Aloe et al. (2004) haben 65 Kornealulcera mit Hilfe von NGF innerhalb von 10 Tagen bis 6 Wochen zur Abheilung gebracht. Tuveri et al. (2000) berichteten über die topische Anwendung von NGF bei 8 Patienten mit Hautulcera im Rahmen einer komplizierenden Immunkomplexvasculitis bei 4 Patienten mit rheumatoider Arthritis und bei 4 Patienten mit

Sklerodermie. Bei den RA-Patienten waren die Ulcera innerhalb von 6-8 Wochen geheilt. Schon nach 2 Wochen bestand eine Abnahme der Entzündungszeichen und Schmerzhaftigkeit, sowie eine Zunahme des Granulationsgewebes. Bei den Sklerodermie-Patienten zeigte sich zunächst eine rasche Abnahme der Entzündungszeichen in den ersten 2 Wochen. Dann aber stagnierte der Heilungsprozess, was nicht vollständig erklärbar war. Ursache hierfür könnte die erhebliche progressive microvasculäre Fibrosierung sein, die für diese Erkrankung typisch ist.

Bei einer Patientin mit Diabetes-induziertem Ulcus der Haut (seit 6 Jahren bestehend) fand die Heilung langsamer, aber dennoch innerhalb von 24 Wochen statt (Aloe, 2004). Zu Beginn war das Ulcus-Areal nicht blutend und nicht schmerzhaft. Unter der NGF-Behandlung und dem Heilungsprozess kam es zu Blutungen und zur Zunahme der Schmerzhaftigkeit. Dies spricht für die Fähigkeit von NGF, die Reinnervation und Revascularisierung zu fördern. Auch Druckulcera (bettlägerige Patienten mit Dekubitus), sowie ein Fall einer ischämischen Läsion der Ferse und Zehen wurden erfolgreich behandelt (Aloe, 2004).

Die therapeutische Anwendung von NGF ist wegen der metabolischen Instabilität und wegen der geringen Penetration ins ZNS (wegen der Molekülgröße von NGF wird die Blut-Hirn-Schranke kaum überwunden) limitiert. Dieses Problem könnte durch Wirkstoffe überwunden werden, die die Promoter-Regionen des NGF-Gens induzieren, vermehrt endogenes NGF zu bilden. Zum Beispiel konnten die Behandlung einer Maus-Zell-Linie (L929) mit Substanzen wie PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Calcitrol (1,25-Dihydroxy-Vitamin D3) eine vermehrte Transkription am Promotor des Exon 1 und Exon 3 induzieren (Racke et al., 1996). Vom Calcitrol wurde gezeigt, dass es in Osteoblasten die NGF-Expression über Aktivierung eines NGF-Promotors erhöht (Veenstra et al., 1998).

Im Hinblick auf eine therapeutische, systemische Anwendung von NGF haben Nguyen et al. (2000) bei Affen die Verteilung von radioaktiv markiertem NGF nach einmaliger und mehreren s.c. Injektionen untersucht. Dabei wurde den Affen 0.8µg/kg rekombiniertes menschliches NGF s.c. zwischen die Scapulae injiziert. Histologische Gewebeuntersuchungen zeigten zunächst eine Anflutung in den axillären Lymphknoten, entsprechend der Drainierung der injizierten Stelle. Die daraufhin ansteigende radioaktive Markierung im peripheren Nervensystem entspricht der spezifischen Aufnahme von NGF durch sensorische und sympathische Neurone mit einer hohen Dichte an TrkA-Rezeptoren. Die niedrigste Radioaktivität wurde im Gehirn gemessen, was mit der limitierten Aufnahme ins ZNS aufgrund der Blut-Hirn-Schranke zu erklären ist. Erst nach

mehrfachen und höheren s.c. Applikationen von NGF (2mg/kg) waren die Plasmakonzentrationen von NGF erhöht, evtl. wegen der Sättigung der neuronalen Rezeptoren. Die histologischen Untersuchungen zeigten auch eine Anreicherung von radioaktiv markiertem NGF in Nerven in unmittelbarer Nähe von großen Blutgefäßen in Nieren, Milz, Leber und Speicheldrüsen. Große Neurone in sympathischen Ganglien, sowie in den dorsalen Wurzelganglien waren ebenso angereichert. Die prädominierende Form des NGF war das 13kDa Monomer, was für einen aktiven Metabolismus von ^{125}I -rh-NGF in Niere, Leber und vor allem im peripheren Nervensystem spricht. Der ^{125}I -rh-NGF-Komplex war im Plasma am längsten stabil (bis zu 24h). Die Elimination erfolgte überwiegend renal. Die Ergebnisse zeigten, dass nach s.c. Applikation von NGF die Aufnahme in sensorische und sympathische Neurone stattfindet. Die Accumulation von NGF in diesen Neuronen könnte für eine Behandlung von peripheren Neuropathien ausreichen.

Die zunehmende Kenntnis immunpathologischer Zusammenhänge unter anderem bei systementzündlichen rheumatischen Erkrankungen, in die auch NGF involviert ist, könnte zu verbesserten therapeutischen Strategien beitragen, wie dies bei dem Zytokinantagonisten für TNF- α gelungen ist, der bei therapierefraktären Fällen der rheumatoiden Arthritis und Spondylitis ankylosans zum Einsatz kommt. Interessant wären in diesem Zusammenhang die NGF- und Neuropeptid-Spiegel bei den mit Zytokinantagonisten behandelten Patienten. Vor dem therapeutischen Einsatz von NGF-Antikörpern/Antagonisten bei arthritischen Prozessen, oder NGF-Applikationen zur Unterstützung von Reparaturvorgängen bei Nervenverletzungen oder neurodegenerativen Erkrankungen, bedarf es noch ausgiebiger, weiterer Untersuchungen. Die entscheidende Frage, ob NGF, neben seinen protektiven Einflüssen im Nervensystem, bei entzündlich-rheumatischen/autoimmunen Erkrankungen überwiegend proinflammatorisch oder antiinflammatorisch wirkt, ist noch nicht eindeutig beantwortet. In dieser Metaanalyse wurde erörtert, dass NGF neben seiner neurotrophen Wirkung in die Funktion des Immunsystems eingreift und bei autoimmunen Erkrankungen eine pathophysiologische Rolle spielt. Bei den rheumatisch/autoimmunen Erkrankungen kommt dem pathologisch aktivierten Immunsystem eine Schlüsselrolle zu. Zum Beispiel wird den von den T-Helferzellen produzierten TH2-Typ-Zytokinen und den Mastzellen bei diesen Erkrankungen eine pathogenetische Rolle zugeschrieben (Maggi et al., 1991; Sher und Coffman, 1992; Via et al., 1993). Beide produzieren unter entzündlichen Bedingungen vermehrt NGF und seinen Rezeptor (Lambiase et al., 1997),

was wiederum weitere Mastzellen degranuliert und zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. Das vermehrt gebildete NGF wirkt wiederum auf andere Zellen des Immunsystems wie z.B. auf basophile Granulozyten, die dann unter dem Einfluss von NGF vermehrt Entzündungsmediatoren ausschütten (Bischoff und Dahinden, 1992). Auch die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen wird von NGF gefördert (Ottens et al., 1989; Kimata et al., 1991). Der chemotaktische Effekt von NGF auf Leukozyten kann direkt sein (Boyle et al., 1985; Gee et al., 1983), oder auch indirekt über die Mastzellen-Aktivierung und der nachfolgend vermehrten Adhärenz an Blutgefäßwände, vermehrten Emigration und Akkumulation von Leukozyten (Kubes und Granger, 1996). Dass diese unterschiedlichen Mechanismen nur reparierende Wirkungen von NGF sind, ist unwahrscheinlich. Von einer anti-NGF-Therapie wäre vorstellbar, dass sie über verschiedene Mechanismen antiinflammatorisch wirken würde: Reduktion der Proliferation von Mastzellen (somit reduzierte Expression von inflammatorischen Substanzen und NGF), verminderte Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (dadurch Reduktion der Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α und IL-1), Herabsetzung der Leukozytenevasion und der Gefäßpermeabilität, Herunterfahren der bei autoimmunen Prozessen exazerbierten Immunantworten, verminderte Produktion von Neuropeptiden wie SP und CGRP (somit Reduktion der neurogenen Entzündung) und nicht zuletzt antiinflammatorische Wirkung über die reduzierte NF- κ B Aktivierung. Zusätzlich ist der analgetische Effekt von einer anti-NGF Therapie ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt.

In der Zusammenschau aller in dieser Metaanalyse erläuterten Zusammenhänge scheint NGF neben seinem neurotrophen Wirkspektrum doch eher proinflammatorisch zu wirken, womit sich dadurch neue Therapiemöglichkeiten bei entzündlich-rheumatischen Erkrankungen ergeben würden.

6 Zusammenfassung

NGF ist ein neurotropher Mediator, der die Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung von sensorischen und sympathischen Neuronen reguliert. Erst in den letzten Jahren wurden zusätzliche Funktionen außerhalb des Nervensystems bekannt. In dieser Metaanalyse wurden die Rolle von NGF im Nerven-, Immun-, und endokrinen System dargestellt. Das Anliegen dieser Arbeit war die Bewertung der NGF-Beteiligung an entzündlich-rheumatischen und degenerativen Systemerkrankungen. Dabei wurde kritisch überprüft, ob NGF bei diesen Erkrankungen pro- oder antiinflammatorisch wirkt, und ob sich daraus therapeutische Aspekte ergeben.

Aus der Tabelle 2 ist zu erkennen, dass sowohl bei entzündlichen, als auch degenerativen Erkrankungen die Konzentrationen von NGF im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen deutlich erhöht sind. Die Beteiligung von NGF an der neurogenen Entzündung, der Hyperalgesie bei inflammatorischen Gewebsveränderungen, sowie seine Wechselwirkungen mit proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und anderen Entzündungsmediatoren des Immunsystems lassen eine proinflammatorische Wirkung von NGF vermuten. Hieraus sind neue Therapieansätze denkbar. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Überlegungen zu bestätigen.

7 Literaturverzeichnis

1. Aalto K, Korhonen L, Lahdenne P, Pelkonen P and Lindholm D. Nerve growth factor in serum of children with systemic Lupus erythematosus is correlated with disease activity. *Cytokine* 2002; 20: 136-139
2. Abbadie C and Besson JM. c-fos expression in rat lumbar spinal cord during the development of adjuvant-induced arthritis. *Neurosci.* 1992; 48: 985-993
3. Abe T, Morgan DA and Gutterman DD. Protective role of nerve growth factor against postischemic dysfunction of sympathetic coronary innervation. *Circulation* 1997; 95: 213-240
4. Accorinti M, Bruscolini A, Lambiase A, Speranza S, Bonini S and Pivetti-Pezzi P. Nerve growth factor in Behçet's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 528: 283-285
5. Adams ME and Brandt KD. Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J. Rheumatol.* 1991; 18: 428-435
6. Adler R, Landa KB, Manthorpe M and Varon S. Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 1979; 204: 1434-1436
7. Aizenman Y, Weichsel ME Jr and De Vellis J. Changes in insulin and transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 2263-2266
8. Akira S, Taga T and Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 1993, 54: 1-78
9. Al'Abadie MS, Senior HJ, Bleehe SS and Gawkrödger DJ. Neuropeptides and general neuronal marker in psoriasis - an immunohistochemical study. *Clin. Exp. Dermatol.* 1995; 20: 384-389
10. Alleva E, Aloe L and Bigi S. An updated role for nerve growth factor in neurobehavioural regulation of adult vertebrates. *Rev. Neurosci.* 1993; 4: 41-62
11. Aloe L and Levi-Montalcini R. Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor. *Brain Res.* 1977; 133: 358-366
12. Aloe L and Levi-Montalcini R. Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells in vivo into sympathetic neurons: effects of antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 1246-1250
13. Aloe L, Cozzari C and Levi-Montalcini R. The submaxillary salivary glands of the African rodent *Praomys (mastomys) natalensis* as the richest available source of the nerve growth factor. *Exp. Cell. Res.* 1981; 133: 475-480
14. Aloe L, Alleva E, Böhm A and Levi-Montalcini R. Aggressive behaviour induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 6184-6187
15. Aloe L. The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cells in vivo. *J. Neuroimmunol.* 1988; 18: 1-12
16. Aloe L. Adrenalectomy decreases nerve growth factor in young adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 5636-5640
17. Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U and Levi-Montalcini R. Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis. Rheum.* 1992a; 35: 351-355
18. Aloe L, Tuveri MA and Levi-Montalcini R. Studies on the carrageenan-induced arthritis in adult rats: presence of nerve growth factor and role of sympathetic innervation. *Rheumatol Int* 1992b; 12: 213-216
19. Aloe L, Tuveri MA and Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and distribution of mast cells in the synovium of adult rats. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1992c; 10: 203-204
20. Aloe L, Probert L, Kollias G, Bracci-Laudiero L, Spillantini MG and Levi-Montalcini R. The synovium of transgenic arthritic mice expressing human tumor necrosis factor contains a high level of nerve growth factor. *Growth Factors* 1993; 9: 149-155

21. Aloe L, Skaper SD, Leon A and Levi-Montalcini R. Nerve growth factor and autoimmune diseases. *Autoimmunity* 1994a; 19: 141-150
22. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A and Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994b; 91: 10440-10444
23. Aloe L, Probert L, Kollias G, Micera A and Tirassa P. Effect of NGF antibodies on mast cell distribution, histamine and substance P levels in the knee joint of TNF-arthritic transgenic mice. *Rheumatol Int* 1995; 14: 249-252
24. Aloe L, Tuveri M, Guerra G, Pinna L, Tirassa P, Micera A and Alleva E. Changes in human plasma nerve growth factor level after chronic alcohol consumption and withdrawal. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996; 20:462-465
25. Aloe L and Tuveri MA. Nerve growth factor and autoimmune rheumatic disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1997; 15: 433-438
26. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S and Manni L. The expanding role of nerve growth factor: from the neurotrophic activity to immunological diseases. *Allergy* 1997; 52: 883-904
27. Aloe L, Manni L, Sebastiani G and Tuveri MA. Nerve growth factor in the synovia of patients with rheumatoid arthritis: Correlation with TNF- α and IL-1 β and possible functional significance. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1999; 17: 632-633
28. Aloe L. Nerve growth factor, human skin ulcers and vascularization. Our experience. *Prog. Brain Res.* 2004; 146: 515-522
29. Alvarez FJ, Cervantes C, Blasco I, Villalba R, Martinez-Murillo R, Polak JM and Rodrigo J. Presence of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and substance P (SP) immunoreactivity in intraepidermal free nerve endings of cat skin. *Brain Res.* 1988; 442: 391-395
30. Amann R, Sirinathsingji DJS, Donnerer J, Liebmann I and Schuligoi R. Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: bilateral response to unilateral intraplantar injections. *Neurosci. Lett.* 1996; 203: 171-174
31. Amann R, Egger T and Schuligoi R. The tachykinin NK1 receptor antagonist SR140333 prevents the increase of nerve growth factor in rat paw skin induced by substance P or neurogenic inflammation. *Neurosci.* 2000; 100: 611-615
32. Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE and Sinicropi DV. The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy. *Nat. Med.* 1996; 2: 703-707
33. Anand P, Parrett A, Chadwick L and Hamlyn P. Nerve growth factor concentrations in human cerebral blood vessels. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1997; 62: 199-200
34. Angeletti RH. Studies on the nerve growth factor (NGF) from snake venom molecular heterogeneity. *J. Chromatogr.* 1968; 37: 62-69
35. Angeletti PU and Levi-Montalcini R. Growth regulation of the sympathetic nervous system: immunosympathectomy and chemical sympathectomy. *Eur. J. Clin. Biol. Res.* 1971; 16: 866-874
36. Anichini M, Cesaretti S, Lepori M, Maddali-Bongi S, Maresca M and Zoppi M. Substance P in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rev. Rhum.* 1997; 64: 18-21
37. Apfel SC, Arezzo JC, Brownlee M, Federoff H and Kessler JA. Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. *Brain Res.* 1994, 634: 7-12
38. Apfel SC, Schwartz S, Adornato BT, Freeman R, Biton V, Rendell M, Vinik A, Giuliani M, Stevens JC, Barbano R and Dyck PJ. Efficacy and safety of recombinant human nerve growth factor in patients with diabetic Polyneuropathy: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000; 284: 2215-2221
39. Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundeberg T, Nylander M and Theodorsson E. Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study. *Scand. J. Dent. Res.* 1991; 99: 519-521

40. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N and Yokata T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochem.* 1990; 59: 783-836
41. Arakawa Y, Sendtner M and Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J. Neurosci.* 1990; 10: 3507-3515
42. Arimura A and Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol.* 1995; 16: 53-88
43. Arnalich F, de Miguel E, Perez Ayala C, Martinez M, Vazquez JJ, Gijon Banos J and Hernanz A. Neuropeptides and interleukin-6 in human joint inflammation. Relationship between intraarticular substance P and interleukin-6 concentrations. *Neurosci. Lett.* 1994; 170: 251-254
44. Arvidsson U, Piehl F, Johnson H, Ulfhake B, Cullheim S and Hökfelt T. The peptidergic motorneurone. *Neuro. Report* 1993; 4: 849-856
45. Asami K, Nakanishi T, Asahara H, Inoue H and Takigawa M. Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. *Bone* 2000; 26: 625-633
46. Averill S, Mc Mahon SB, Clary DO, Reichardt LF and Priestley JV. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur. J. Neurosci* 1995; 7: 1484-1494
47. Avignone E, Molnar M, Berretta N, Casamenti F, Prospero C, Ruberti F, Cattaneo A and Cherubini E. Cholinergic function in the hippocampus of juvenile rats chronically deprived of NGF. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 1998; 109: 137-147
48. Bailey GS, Banks BE, Pearce FL and Shipolini RA. A comparative study of nerve growth factors from snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B* 1975; 51: 429-438
49. Baker GH. Life events before the onset of rheumatoid arthritis. *Psychother. Psychosom.* 1982; 38: 173-177
50. Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Beiliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG and Miller FD. The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death. *J. Cell. Biol.* 1998; 140: 911-923
51. Barbacid M. Nerve growth factor: a tale of two receptors. *Oncogene* 1993; 8: 2033-2042
52. Barbin G, Manthorpe M and Varon S. Purification of the chick eye ciliary neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 1984; 43: 1468-1478
53. Barde YA, Edgar D and Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982; 1: 549-553
54. Barker PA and Murphy RA. The nerve growth factor receptor: a multicomponent system that mediates the actions of the neurotrophin family of proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 1992; 110: 1-15
55. Barker PA and Shooter EM. Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to trkA on PC12 cells. *Neuron* 1994; 13: 203-215
56. Barker PA, Barbee G, Misko TP and Shooter EM. The low affinity receptor, p75LNTR, is palmitoylated by thioester formation through cysteine 279. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 30645-30650
57. Barker PA. p75NTR: a study in contrasts. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 346-356
58. Barnes PJ, Brown MJ, Dollery CT, Fuller RW, Heavey DJ and Ind PW. Histamine is released from skin by substance P but does not act as the final vasodilator in the axon reflex. *Br. J. Pharmacol.* 1986; 88: 741-745
59. Barrett GL and Bartlett PF. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 6501-6505
60. Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D and Dorsa DM. Insulin in the brain. *Ann. Rev. Physiol.* 1987; 49: 335-347

61. Bauer J and Herrmann F. Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann Hematol.* 1991, 62: 203-210
62. Bayliss WM. On the origin from the spinal cord of vasodilator fibers of the hind limb, and on the nature of these fibers. *J. Physiol. London* 1901; 26: 173-209
63. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL and Yoon SO. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 2002; 36: 375-386
64. Beck PW and Handwerker HO. Bradykinin and serotonin effects on various types of cutaneous nerve fibers. *Pflügers Arch.* 1974; 347: 209-222
65. Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D and Miller FD. NGF and Neurotrophin-3 both activate trkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis. *J. Cell. Biol.* 1997; 136: 375-388
66. Bennett MR, Gibson WG and Lemon G. Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on. *Autonomic Neurosci.: Basic and clinical* 2002; 95: 1-23
67. Berger EA and Shooter EM. Evidence for pro- β -nerve growth factor, a biosynthetic precursor to β -nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 3647-3651
68. Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV and Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 1991; 7: 857-866
69. Bernd P and Greene LA. Association of 125I-NGF with PC12 pheochromocytoma cells. Evidence for internalization via high-affinity receptors only and for long-term regulation by nerve growth factor of both high- and low-affinity receptors. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 15509-15516
70. Bibel M, Hoppe E and Barde YA. Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J.* 1999; 18: 616-622
71. Biedert RM, Stauffer E and Friederich NF. Occurrence of free nerve endings in the soft tissue of the knee joint. A histologic investigation. *Am. J. Sports Med.* 1992; 20: 430-433
72. Bileviciute I, Lundeberg T, Ekblom A and Theodorsson E. Bilateral changes of substance P-, neurokinin A-, calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in rat knee joint synovial fluid during acute monoarthritis. *Neurosci. Lett.* 1993; 153: 37-40
73. Bischoff SC and Dahinden CA. Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 1992; 79: 2662-2669
74. Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE and Hermansson A. Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 1986; 243: 51-57
75. Bjorling DE and Wang Z. Estrogen and neuroinflammation. *Urology* 2001; 57(6 Suppl 1): 40-46
76. Bjurholm A, Kreicbergs A, Brodin E and Schultzberg M. Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides* 1988; 9: 165-171
77. Bondeson J, Foxwell B, Brennan F and Feldmann M. Defining therapeutic targets by using adenovirus: blocking NF- κ B inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares anti-inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 5668-5673
78. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, Bakker PM and Cormane RH. Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immunophenotyping with monoclonal antibodies. *Arch. Dermatol. Res.* 1983; 275: 181-189
79. Bost KL and Pascual DW. Substance P: A late-acting B lymphocyte differentiation cofactor. *Am. J. Physiol.* 1992; 262(3 PT 1): C537-C545
80. Bothwell MA and Shooter EM. Thermodynamics of interaction of the subunits of 7S nerve growth factor. The mechanism of activation of the esterase activity by chelators. *J. Biol. Chem.* 1978; 253: 8458-8464
81. Bouchard P, Maurice T, St-Pierre S, Privat A and Quirion R. Neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide attenuate learning impairments induced by MK-801 via sigma receptor-related mechanisms. *Eur. J. Neurosci.* 1997, 9: 2141-2151

82. Boyle MD, Lawman MJP, Gee AP and Young M. Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. *J. Immunol.* 1985; 134: 564-568
83. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Galeazzi M, Schilter D, Scully JL and Otten U. Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuro Report* 1993; 4: 563-565
84. Bracci-Laudiero L, Lundeberg T, Stenfors C, Theodorsson E, Tirassa P and Aloe L. Modifikation of lymphoid and brain nerve growth factor levels in systemic lupus erythematosus mice. *Neurosci. Lett.* 1996a; 204: 13-16
85. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Stenfors C, Tirassa P, Theodorsson E and Lundeberg T. Nerve growth factor stimulates production of neuropeptide Y in human lymphocytes. *Neuroreport* 1996b; 7: 485-488
86. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Stenfors C, Theodorsson E and Lundberg T. Development of systemic lupus erythematosus in mice is associated with alteration of neuropeptide concentrations in inflamed kidneys and immunoregulatory organs. *Neurosci. Lett.* 1998; 248: 97-100
87. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Buanne P, Finn A, Stenfors C, Vigneti E, Theodorsson E and Lundeberg T. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J. Neuroimmunol.* 2002; 123: 58-65
88. Brain SD, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I and Williams TJ. Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1986; 87: 533-536
89. Brain SD and Williams TJ. Substance P regulates the vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide. *Nature.* 1988; 335: 73-75
90. Brennan FM, Maini RN and Feldmann M. TNF alpha—a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br. J. Rheumatol* 1992; 31: 293-298
91. Brennan FM, Maini RN and Feldmann M. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Sem. Immunopathol.* 1998; 20: 133-147
92. Breslauer F. Die Pathogenese des trophischen Gewebes Schadens nach der Nervenverletzung. *Chir. Deut. Z.* 1919; 150: 50-81
93. Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ and Thomas G. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- β -NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 2851-2859
94. Brodie C and Gelfand EW. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J. Immunol.* 1992; 148: 3492-3497
95. Brodie C and Gelfand EW. Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: comparison with anti-CD 40. *J. Neuroimmunol.* 1994; 52: 87-96
96. Bruce NA. Über die Beziehung der sensiblen Nervenendigungen zum Entzündungsvorgang. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1910; 63: 424-433
97. Bruce NA. Vasodilator axon-reflexes. *Q.J. Exp. Physiol.* 1913; 6: 339-354
98. Bruni A, Bigon E, Boarato E, Mietto L, Leon A and Toffano G. Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells. *FEBS Lett.* 1982; 138: 190-193
99. Buckley TL, Brain SD, Collins PD and Williams TJ. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J. Immunol.* 1991; 146: 3424-3430
100. Bueker ED. Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbo-sacral nervous system. *Anat. Rec.* 1948; 102: 368-390
101. Buj-Bello A, Buchman VL, Horton A, Rosenthal A and Davies AM. GDNF is an age-specific survival factor for sensory and autonomic neurons. *Neuron* 1995; 15: 821-828
102. Bull HA, Leslie TA, Chopra S and Dowd PM. Expression of nerve growth factor receptors in cutaneous inflammation. *Br. J. Dermatol.* 1998; 139: 776-783

103. Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G and Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 5-18
104. Calvo CF, Chavanel G and Senik A. Substance P enhances interleukin-2 expression in activated human T cells. *J. Immunol.* 1992; 148: 3498-3504
105. Campenot RB. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev. Biol.* 1982; 93: 13-21
106. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappalá G, Pafumi C and Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB* 2002; 16: 1307-1309
107. Cardell LO, Stjärne P, Wagstaff SJ, Agusti C and Nadel JA. PACAP-induced plasma extravasation in rat skin. *Regul. Pept.* 1997; 71: 67-71
108. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT and Chao MV. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996; 383: 716-719
109. Cattaneo A, Capsoni S, Margotti E, Righi M, Kontsekova E, Pavlik P, Filipcik P and Novak M. Functional blockade of tyrosine kinase A in the rat basal forebrain by a novel antagonistic anti-receptor monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 1999; 19: 9687-9697
110. Chakrabarti S, Sima AA, Lee J Brachet P and Dicou E. Nerve growth factor (NGF), proNGF and receptor-like immunoreactivity in BB rat retina. *Brain Res.* 1990; 523: 11-15
111. Chang JC, Smith LR, Froning KJ, Kurland HH, Schwabe BJ, Blumeyer KK, Karasek MA, Wilkinson DI, Farber EM, Carlo DJ and Brostoff SW. Persistence of T-cell clones in psoriatic lesions. *Arch. Dermatol.* 1997; 133: 703-708
112. Chapman CA, Banks BE, Vernon CA and Walker JM. The isolation and characterization of nerve growth factor from the prostate gland of the guinea-pig. *Eur. J. Biochem.* 1981; 115: 347-351
113. Chen KS and Gage FH. Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration. *J. Neurosci.* 1995; 15: 2819-2825
114. Chen Y, Dicou E and Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor expression in rat round spermatids and the trophic effects of nerve growth factor in the maintenance of Sertoli cell viability. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1997; 127: 129-136
115. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Putter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 1979; 18: 5294-5299
116. Cimino M, Cattabeni F, Di Luca M, Peruzzi G, Andena M, Tirassa P, Angelucci F, Cozzari C and Aloe L. Levels of NGF, p75 NGFR and ChAT immunoreactivity in brain of adult and aged microencephalic rats. *Neurobiol. Aging* 1996; 17: 137-142
117. Cleary J, Semotuk M and Levine AS. Effects of neuropeptide Y on short-term memory. *Brain Res.* 1994; 653: 210-214
118. Coderre TJ, Chan AK, Helms C, Basbaum AI and Levine JD. Increasing sympathetic nerve terminal-dependent plasma extravasation correlates with decreased arthritic joint injury in rats. *Neurosci* 1991; 40: 185-189
119. Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL and Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain* 1993; 52: 259-285
120. Cohen P, Sutter A, Landreth G, Zimmermann A and Shooter EM. Oxidation of tryptophan-21 alters the biological activity and receptor binding characteristics of mouse nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1980; 255: 2949-2954
121. Cohen S, Levi-Montalcini R and Hamburger V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1954; 40: 1014-1018
122. Cohen S. and Levi-Montalcini R. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1956; 42: 571-574

123. Cohen S. Purification and metabolic effects of a nerve growth promoting protein from snake venom. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 1129-1137
124. Cohen S. Purification of a nerve growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1960; 46: 302-311
125. Contreras ML and Guroff G. Calcium-dependent nerve growth factor-stimulated hydrolysis of phosphoinositides in PC12 cells. *J. Neurochem.* 1987; 48: 1466-1472
126. Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Lamballe F, Kovary K, Klein R, Jones KR, Reichardt LF and Barbacid M. The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991, 66: 173-183
127. Coyle JT, Price DL and De Long MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 1983; 219: 1184-1190
128. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD and Phillips HS. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994; 76: 1001-1011
129. Cruwys SC, Garrett NE and Kidd BL. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. *Neurosci. Lett.* 1995; 193: 205-207
130. Cuello AC, Garofalo L, Liberini P and Maysinger D. Cooperative effects of gangliosides on trophic factor-induced neuronal cell recovery and synaptogenesis: studies in rodents and subhuman primates. *Prog. Brain Res.* 1994; 101: 337-355
131. da Silva JA, Fonseca JE, Graca L, Moita L and Carmo-Fonseca M. Reinnervation of post-arthritic joints in the rat. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1996; 14: 43-51
132. Darling TLJ, Petrides PE, Beguin P, Frey P, Shooter EM, Selby M and Rutter WJ. The biosynthesis and processing of proteins in the mouse 7S nerve growth factor complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1983; 48(Pt 1): 427-434
133. Darling TLJ and Fahnestock M. The high molecular weight nerve growth factor complex from *Mastomys natalensis* differs from the murine nerve growth factor complex. *Biochemistry* 1988; 27: 6686-6692
134. Davies AM, Bandtlow C, Heumann R, Korsching S, Rohrer H and Thoenen H. Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor. *Nature* 1987; 326: 353-358
135. Davis BM, Lewin GR, Mendell LM, Jones ME and Albers KM. Altered expression of nerve growth factor in the skin of transgenic mice leads to changes in response to mechanical stimuli. *Neurosci.* 1993; 56: 789-792
136. Davis BM, Albers KM, Seroogy KB and Katz DM. Overexpression of nerve growth factor in transgenic mice induces novel sympathetic projections to primary sensory neurons. *J. Comp. Neurol.* 1994; 349: 464-474
137. Debeir T, Saragovi UH and Cuello CA. A nerve growth factor mimetic TrkA antagonist causes withdrawal of cortical cholinergic boutons in the adult rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 4067-4072
138. Delgado M, Pozo D, Martinez C, Leceta J, Calvo JR, Ganea D and Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J. Immunol.* 1999a; 162: 2358-2367
139. Delgado M, Martinez C, Pozo D, Calvo JR, Leceta J, Ganea D and Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activation polypeptide (PACAP) protect mice from lethal endotoxemia through the inhibition of TNF-alpha and IL-6. *J. Immunol.* 1999b; 162: 1200-1205
140. Delsite R and Djakiew D. Characterization of nerve growth factor precursor protein expression by human prostate stromal cells: a role in selective neurotrophin stimulation of prostate epithelial cell growth. *Prostate* 1999; 41: 39-48

141. Denko CW and Gabriel P. Effects of peptide hormones in urate crystal inflammation. *J. Rheumatol.* 1985; 12: 971-975
142. Derynck R. Transforming growth factor alpha. *Cell* 1988; 54: 593-595
143. Devillier P, Renoux M, Giroud JP and Regoli D. Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Eur.J. Pharmacol.* 1985; 117: 89-96
144. Di Luca M, Gardoni F, Finardi A, Pagliardini S, Cattabeni F, Battaglia G and Missale C. NMDA receptor subunits are phosphorylated by activation of neurotrophin receptors in PSD of rat spinal cord. *Neuroreport* 2001; 12: 1301-1305
145. DiStefano PS and Johnson EM. Identification of a truncated form of nerve growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 270-274
DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schik CM, Lindsay RM and Wiegand SJ. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 1992, 8: 983-993
146. Dicou E, Lee J and Brachet P. Synthesis of nerve growth factor mRNA and precursor protein in the thyroid and parathyroid glands of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 7084-7088
147. Dicou E. Interaction of antibodies to synthetic peptides of proNGF with in vitro synthesized NGF precursors. *FEBS Lett.* 1989; 255: 215-218
148. Dicou E, Nerrière V and Labropoulou V. Naturally occurring antibodies against nerve growth factor in human and rabbit sera: comparison between control and herpes simplex virus-infected patients. *J. Neuroimmunol.* 1991; 34: 153-158
149. Dicou E. Nerve growth factor precursors in the rat thyroid and hippocampus. *Mol. Brain Res.* 1992; 14: 136-138
150. Dicou E, Hurez D and Nerrière V. Natural autoantibodies against nerve growth factor in autoimmune diseases. *J. Neuroimmunol.* 1993a; 47: 159-167
151. Dicou E, Masson C, Jabbour W and Nerriere V. Increased frequency of NGF in sera of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 1993b; 5: 321-324
152. Dicou E, Perrot S, Menkes CJ, Masson C and Nerrière V. Nerve growth factor (NGF) autoantibodies and NGF in the synovial fluid: Implications in spondylarthropathies. *Autoimmunity* 1996; 24: 1-9
153. Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV and Hannun YA. Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* 1994; 265: 1596-1598
154. Dobrowsky RT, Jenkins GM and Hannun YA. Neurotrophins induce sphingomyelin hydrolysis: modulation by co-expression of p75NTR with trk receptors. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 22135-22142
155. Doherty P, Seaton P, Flanigan TP and Walsh FS. Factors controlling the expression of the NGF receptor in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 1988; 92: 222-227
156. Domenici L, Fontanesi G, Cattaneo A, Bagnoli P and Maffei L. Nerve growth factor (NGF) uptake and transport following injection in the developing rat visual cortex. *Vis. Neurosci.* 1994a; 11: 1093-1102
157. Donnerer J, Schuligoi R and Stein C. 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. *Neurosci.* 1992; 49: 693-698
158. Dostaler SM, Ross GM, Myers SM, Weaver DF, Ananthanarayanan V and Riopelle RJ. Characterization of a distinctive motif of the low molecular weight neurotrophin receptor that modulates NGF-mediated neurite outgrowth. *Eur. J. Neurosci.* 1996; 8: 870-879
159. Dun EC, Huang RL, Dun SL and Dun NJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-immunoreactivity in human spinal cord and dorsal root ganglia. *Brain Res.* 1996; 721: 233-237
160. Dyck PJ, Peroutka S, Rask C, Burton E, Baker MK, Lehman KA, Gillen DA, Hokanson JL and O'Brian PC. Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. *Neurology* 1997; 48: 501-505

161. Ebendal T. Stage-dependent stimulation of neurite outgrowth exerted by nerve growth factor and chick heart in cultured embryonic ganglia. *Dev. Biol.* 1979; 72: 276-290
162. Ebendal T, Larhammar D and Persson H. Structure and expression of the chicken beta-nerve growth factor gene. *EMBO. J.* 1986; 5: 1483-1487
163. Eckenstein FP, Esch F, Holbert T, Blacher RW and Nishi R. Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors. *Neuron* 1990, 4: 623-631
164. Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, Ottosson A and Uddman R. Peptide-containing nerve fibers in human cerebral arteries: immunocytochemistry, radioimmunoassay, and in vitro pharmacology. *Ann. Neurol.* 1987; 21: 431-437
165. Edvinsson L and Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache. *Cephalalgia* 1995; 15: 272-276
166. Edwall D, Schalling M, Jennische E and Norstedt G. Induktion of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinol.* 1989; 124: 820-825
167. Edwards RH, Selby MJ, Garcia PD and Rutter WJ. Processing of the native nerve growth factor precursor to form biologically active nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1988a; 263: 6810-6815
168. Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hurby DE and Rutter WJ. Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Mol. Cell. Biol.* 1988b; 8: 2456-2464
169. Eedy DJ, Johnston CF, Shaw C and Buchanan KD. Neuropeptides in psoriasis: an immunocytochemical and radioimmunoassay study. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 96: 434-438
170. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B and Weinberger DR. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 2003; 112: 257-269
171. Ehlers MD, Kaplan DR, Price DL and Koliatsos VE. NGF-stimulated retrograde transport of trkA in the mammalian nervous system. *J. Cell. Biol.* 1995; 130: 149-156
172. Ehrhard PB, Ganter U, Bauer J and Otten U. Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993a; 90: 5423-5427
173. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U and Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1993b; 90: 10984-10988.
174. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Schmutz B and Otten U. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J. Immunol.* 1994; 152: 2705-2709
175. Eide FF, Lowenstein DH and Reichardt LF. Neurotrophins and their receptors - current concepts and implications for neurologic disease. *Exp. Neurol.* 1993; 121: 200-214
176. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L and Madeddu P. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimb. *Circulation* 2002; 106: 2257-2262
177. End D, Tolson N, Hashimoto S and Guroff G. Nerve growth factor-induced decrease in the cell-free phosphorylation of a soluble protein in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 6549-6555
178. Eriksson Jönhagen M, Nordberg A, Amberla K, Bäckman L, Ebendal T, Meyerson B, Olson L, Seiger Å, Shigetani M, Theodorsson E, Viitanen M, Winblad B and Wahlund L-O. Intracerebroventricular infusion of nerve growth factor in three patients with Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1998; 9: 246-257
179. Ernfors P, Ibáñez CF, Ebendal T, Olson L and Persson H. Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarity to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 5454-5458
180. Ernfors P, Lee KF, Kucera J and Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell* 1994a; 77: 503-512

181. Ernfors P, Lee KF and Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature* 1994b; 368: 147-150
182. Evans BA and Richards RI. Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO J* 1985; 4: 133-138
183. Fahnstock M and Bell RA. Molecular cloning of a cDNA encoding the nerve growth factor precursor from *Mastomys natalensis*. *Gene* 1988; 69: 257-264
184. Fahnstock M, Michalski B, Xu B and Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2001; 18: 210-220
185. Fahnstock M, Yu G, Michalski B, Colquhoun A, Ross GM and Coughlin MD. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits activity but is less active than mature nerve growth factor. *J. Neurochem.* 2004; 89: 581-592
186. Falcini F, Matucci Cerinic M, Ermini M, Generini S, Lombardi A, Pignono A, Leoncini G, Tirassa P and Aloe L. Nerve growth factor circulating levels are increased in Kawasaki disease: correlation with disease activity and reduced angiotensin converting enzyme levels. *J. Rheumatol.* 1996a; 23: 1798-1802
187. Falcini F, Matucci Cerinic M, Lombardi A, Generini S, Pignone A, Tirassa P, Ermini M, Lepore L, Partsch G and Aloe L. Increased circulating nerve growth factor is directly correlated with disease activity in juvenile chronic arthritis. *Ann Rheum. Dis.* 1996b; 55: 745-748
188. Fallon JH, Seroogy KB, Loughlin SE, Morrison RS, Bradshaw RA, Knaver DJ and Cunningham DD. Epidermal growth factor immunoreactive material in the central nervous system: location and development. *Science* 1984; 224: 1107-1109
189. Fallon JH, Annis CM, Gentry LE, Twardzik DR and Loughlin SE. Localization of cells containing transforming growth factor- α precursor immunoreactivity in the basal ganglia of the adult rat brain. *Growth factors* 1990; 2: 241-250
190. Fantini F, Magnoni C, Bracci-Laudiero L and Pincelli C. Nerve growth factor is increased in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.* 1995; 105: 854-855
191. Farber EM and Peterson JB. Variations in the history of psoriasis. *Calif. Med.* 1961; 95: 6-11
192. Farber EM, Chan J, Raychaudhuri S and Smoller BR. Increased nerve growth factor receptor (NGF-R) in papillary dermis of lesional psoriatic skin: further evidence for a role of the sensory nervous systems in the pathogenesis of psoriasis. *Br. J. Dermatol* 1996; 135: 841
193. Farber EM and Raychaudhuri SP. Is psoriasis a neuroimmunologic disease? *Int. J. Dermatol.* 1999; 38: 12-15
194. Fayad W, Czernichow P and Scharfmann R. Implication of nitric oxide in NGF-induced cell differentiation: differences between neuronal and beta cells. *J. Neuroendocrinol.* 1997; 9: 807-812
195. Ferrell WR and Russell NJ. Extravasation in the knee induced by antidromic stimulation of articular C fibre afferents of the anaesthetized cat. *J. Physiol.* 1986; 379: 407-416
196. Finn TP and Nishi R. Expression of a chicken ciliary neurotrophic factor in targets of ciliary ganglion neurons during and after the cell-death phase. *J. Comp. Neurol.* 1996; 366: 559-571
197. Fioravanti A, Govoni M, La Montagna G, Perpignano G, Tirri G, Trotta F, Bogliolo A, Ciocci A, Mauceri MT and Marcolongo R. Somatostatin 14 and joint inflammation: evidence for intraarticular efficacy of prolonged administration in rheumatoid arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1995; 21: 97-103
198. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 1781-1790
199. Fisher W, Wictorin K, Björklund A, Williams LR, Varon S and Gage FH. Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 1987; 329: 65-68
200. Fitch FW, Lancki DW and Gajewski TF. T cell-mediated immune regulation. Help and suppression. In: Paul, W.E., editor. *Fundamental immunology*, 3rd ed. New York: Raven Press 733-745

201. Fitzgerald M, Wall PD, Goedert M and Emson C. Nerve growth factor counteracts the neurophysiological and neurochemical effects of chronic sciatic nerve section. *Brain Res.* 1985; 332: 131-141
202. Fitzgerald M. Arthritis and the nervous system. *TINS* 1989; 12: 86-87
203. Flood JF, Hernandez EN and Morley JE. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Res.* 1987; 421: 280-290
204. Foster CA, Mandak B, Kromer E and Rot A. Calcitonin gene-related peptide is chemotactic for human T lymphocytes. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1992; 657: 397-404
205. Fox DA. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 598-609
206. Frade JM, Rodríguez-Tébar A and Barde YA. Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* 1996; 383: 166-168
207. Francke U, de Martinville B, Coussens L and Ullrich A. The human gene for the beta subunit of nerve growth factor is located on the proximal short arm of chromosome 1. *Science* 1983; 222: 1248-1251
208. Frazier WA, Boyd LF and Bradshaw RA. Interaction of nerve growth factor with surface membranes: biological competence of insolubilized nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1973a; 70: 2931-2935
209. Frazier WA, Hogue-Angeletti RA, Sherman R and Bradshaw RA. Topography of mouse 2.5S nerve growth factor. Reactivity of tyrosine and tryptophan. *Biochemistry* 1973b; 12: 3281-3293
210. Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J and Jayson MIV. Nerve ingrowth into the diseased intervertebral disc in chronic back pain. *Lancet* 1997; 350: 178-181
211. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Baird P, Jeziorska M, Knight MTN, Ross ERS, O'Brien JP and Hoyland JA. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J. Pathol.* 2002; 197: 286-292
212. Frei K, Malipiero UV, Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME and Fontana A. On the cellular source and function of interleukin-6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur. J. Immunol.* 1989; 19: 689-694
213. Frenkel SR, Guerra LA, Mitchell OG and Singh IJ. Nerve growth factor in skeletal tissues of the embryonic chick. *Cell Tissue Res.* 1990; 260: 507-511
214. Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, Verge VM, Moulton R, Boland P, Zlotchenko E, Lindsay RM and Liu L. BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J. Neurosci.* 1995; 15: 1044-1056
215. Furutani K, Koro O, Hide M and Yamamoto S. Substance P- and antigen-induced release of leukotriene B₄, prostaglandin D₂ and histamine from guinea pig skin by different mechanisms in vitro. *Arch. Dermatol. Res.* 1999; 291: 466-473
216. Fusco M, Oderfeld-Nowak B, Vantini G, Schiavo N, Gradkowska M, Zaremba M and Leon A. Nerve growth factor affects uninjured, adult rat septohippocampal cholinergic neurons. *Neurosci.* 1989; 33: 47-52
217. Gadiant RA, Cron KC and Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 1990; 117: 335-340
218. Gadiant RA and Otten U. Differential expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 1993; 153: 13-16
219. Gadiant RA and Otten U. Expression of interleukin-6 (IL-6) and interleukin-6 receptor (IL-6R)mRNAs in rat brain during postnatal development. *Brain Res.* 1994; 637: 10-14
220. Galli SJ, Dvorak AM and Dvorak HF. Basophils and mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. *Proc. Allergy* 1984; 34: 1-141

221. Gargano N, Levi A and Alema S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J. Neurosci. Res.* 1997; 50: 1-12
222. Garofalo L, Ribeiro-da-Silva A and Cuello AC. Nerve growth factor-induced synaptogenesis and hypertrophy of cortical cholinergic terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 2639-2643
223. Garry MG and Hargreaves KM. Enhanced release of immunoreactive CGRP and substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation. *Brain Res.* 1992; 582: 139-142
224. Gazelius B, Brodin E, Olgart L and Panopoulos P. Evidence that substance P is a mediator of antidromic vasodilatation using somatostatin as a release inhibitor. *Acta. Physiol. Scand.* 1981; 113: 155-159
225. Gearing DP, Thut CJ, VandeBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D and Beckmann MP. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 1991; 10: 2839-2848
226. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B, Ziegler SF and Cosman D. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992; 255: 1434-1437
227. Gee AP, Boyle MD, Munger KL, Lawman MJP and Young M. Nerve growth factor: stimulation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, 80: 7215-7218
228. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM et al. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J. Neurosci.* 1984; 4: 3101-3111
229. Giehl KM, Röhrig S, Bonatz H, Gutjahr M, Leiner B, Bartke I, Yan Q, Reichardt LF, Backus C, Welcher AA, Dethleffsen K, Mestres P and Meyer M. Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo. *J. Neurosci.* 2001; 21: 3492-3502
230. Gigante A, Bevilacqua C, Pagnotta A, Manzotti S, Toesca A and Greco F. Expression of NGF, TrkA and p75 in human cartilage. *Eur. J. Histochem.* 2003; 47:339-344
231. Giovengo SL, Russell IJ and Larson AA. Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *J. Rheumatol.* 1999; 26: 1564-1569
232. Glazner GW, Lupien S, Miller JA and Ishii DN. Insulin-like growth factor-II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neurosci.* 1993; 54: 791-797
233. Glick EN. Asymmetrical rheumatoid arthritis after poliomyelitis. *Br. Med. J.* 1967; 3: 26-28
234. Gnahn H, Hefty F, Heumann R, Schwab ME and Thoenen H. NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in brain? *Brain Res.* 1983; 285: 45-52
235. Goadsby PJ and Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann. Neurol.* 1993; 33: 48-56
236. Goedert M, Otten U, Schäfer T, Schwab M and Thoenen H. Immunosympathectomy: lack of evidence for a complement-mediated cytotoxic mechanism. *Brain. Res.* 1980; 201: 399-409
237. Goedert M, Stoeckel K and Otten U. Biological importance of the retrograde axonal transport of nerve growth factor in sensory neurons. *Neurosci.* 1981; 78: 5895-5898
238. Goedert M, Otten U, Hunt SP, Bond A, Chapman D, Schlumpf M and Lichtensteiger W. Biochemical and anatomical effects of antibodies against nerve growth factor on developing rat sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 1580-1584
239. Goetzl EJ and Payan DG. Inhibition by somatostatin of the release of mediators from human basophils and rat leukemic basophils. *J. Immunol.* 1984; 133: 3255-3259
240. Gordon JR and Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature* 1990; 346: 274-276

241. Goss JR, Taffe KM, Kochanek PM and DeKosky ST. The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat. *Exp. Neurol.* 1997, 146: 291-294
242. Gottlieb AB, Lebwohl M, Shirin S, Sherr A, Gilleaudeau P, Singer G, Solodkina G, Grossman R, Gisoldi E, Phillips S, Neisler HM and Krueger JG. Anti-CD4 monoclonal antibody treatment of moderate to severe psoriasis vulgaris: results of a pilot, multicenter, multiple-dose, placebo-controlled study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2000; 43: 595-604
243. Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM and Ralston SH. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate: creatinine ratio. *Arthritis Rheum.* 1996; 39: 643-647
244. Granoth R, Fridkin M and Gozes I. VIP and the potent analog, stearyl-NIe-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS. Lett.* 2000; 475: 78-83
245. Gratto KA and Verge VMK. Neurotrophin-3 down-regulates trkA mRNA, NGF high-affinity binding sites, and associated phenotype in adult DRG neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2003; 18: 1535-1548
246. Green LA. A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res.* 1977; 133: 350-353
247. Green PG, Luo J, Heller PH and Levine JD. Further substantiation of a significant role for the sympathetic nervous system in inflammation. *Neurosci* 1993; 55: 1037-1043
248. Green SH, Rydel RE, Connolly JL and Greene LA. PC12 mutants that possess low- but not high-affinity nerve growth factor receptors neither respond to nor internalise nerve growth factor. *J. Cell. Biol.* 1986; 102: 830-843
249. Greene LA, Shooter EM and Varon S. Enzymatic activities of mouse nerve growth factor and its subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1968; 60: 1383-1388
250. Greene LA, Shooter EM and Varon S. Subunit interaction and enzymatic activity of mouse 7S nerve growth factor. *Biochem.* 1969; 8: 3735-3741
251. Greene LA and Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976; 73: 2424-2428
252. Greene LA and Shooter EM. The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action. *Ann, Rev. Neurosci.* 1980, 3: 353-402
253. Greene LA, Liem RKH and Shelanski ML. Regulation of a high molecular weight microtubule-associated protein in PC12 cells by nerve growth factor. *J. Cell Biol.* 1983; 96: 76-83
254. Greitz D and Hannerz J. A proposed model for the cerebrospinal fluid circulation: observations with radionuclide cisternography. *Am. J. Neuroradiol.* 1996; 17: 431-438
255. Grills BL and Schuijers JA. Immunohistochemical localization of nerve growth factor in fractured and unfractured rat bone. *Acta Orthop. Scand.* 1998; 69: 415-419
256. Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW and Mobley WC. Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* 1996; 16: 7950-7964
257. Gundersen RW and Barrett JN. Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 1979; 206: 1079-1080
258. Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharlt M and Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 1994; 372: 266-269
259. Hagg T, Quon D, Higaki J and Varon S. Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF expression in the adult rat CNS. *Neuron* 1992; 8: 145-158
260. Hall AK and Rao MS. Cytokines and neurokines: related ligands and related receptors. *Trends. Neurosci.* 1992; 15: 35-37

261. Hallbook F, Ibanez CF and Persson H. Evolutionary studies of nerve growth factor family reveal a new member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991; 6: 845-858
262. Halliday DA, Zettler C, Rush RA, Scicchitano R and McNeil JD. Elevated nerve growth factor levels in the synovial Fluid of patients with inflammatory joint disease. *Neurochem. Res.* 1998; 23: 919-922
263. Hama T, Miyamoto M, Tsukui H, Nishio C and Hatanaka H. Interleukin-6 as a neurotrophic factor for promoting the survival of cultured basal forebrain cholinergic neurons from postnatal rats. *Neurosci. Lett.* 1989; 104: 340-344
264. Hama T, Kushima Y, Miyamoto M, Kubota M, Takei N and Hatanaka H. Interleukin-6 improves the survival of mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-week-old rats in cultures. *Neurosci.* 1991; 40: 445-452
265. Hamada A, Watanabe N, Ohtomo H and Matsuda H. Nerve growth factor enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Br. J. Haematol.* 1996; 93: 299-302
266. Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, Goldfarb MP and Yancopoulos GD. The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 1994; 13: 187-201
267. Harper GP, Glanville RW and Thoenen H. The purification of nerve growth factor from bovine seminal plasma. Biochemical characterization and partial amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 8541-8548
268. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Mörl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, and Giehl KM. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2004; 101: 6226-6230
269. Hartung HP and Toyka KV. Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release. *Eur. J. Pharmacol.* 1983; 89: 301-305
270. Hartung HP, Schäfer B, Heining K and Toyka KV. Recombinant interleukin-1 β stimulates eicosanoid production in rat primary culture astrocytes. *Brain Res.* 1989; 489: 113-119
271. Hartung HP, Jung S, Stoll G, Zielasek J, Schmidt B, Archelos JJ and Toyka KV. Inflammatory mediators in demyelinating disorders of the CNS and PNS. *J. Neuroimmunol.* 1992; 40: 197-210
272. Harvima IT, Viinämäki H, Naukkarinen A, Paukkonen K, Neittaanmäki H, Harvima RJ and Horsmanheimo M. Association of cutaneous mast cells and sensory nerves with psychic stress in psoriasis. *Psychother. Psychosom.* 1993; 60: 168-176
273. Hashimoto H, Hagihara N, Koga K, Yamamoto K, Shintani N, Tomimoto S, Mori W, Koyama Y, Matsuda T and Baba A. Synergistic induction of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene expression by nerve growth factor and PACAP in PC12 cells. *J. Neurochem.* 2000; 74: 501-507
274. Hatten ME, Lynch M, Rydel RE, Sanchez J, Joseph-Silverstein J, Moscatelli D and Rifkin DB. In vitro neurite extension by granule neurons is dependent upon astroglial-derived fibroblast growth factor. *Dev. Biol.* 1988, 125: 280-289
275. Hattori A, Tanaka E, Murase K, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, Hayashi K and Kohno M. Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 2577-2582
276. Hawkins RA, Claman HN, Clark RAF and Steigerwald JC. Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis? *Ann. Inter. Med.* 1985; 102: 182-186
277. Hefti F. Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transection. *J. Neurosci.* 1986; 6: 2155-2162
278. Hefti F, Hartikka J and Knusel B. Function of neurotrophic factors in the adult and aging brain and their possible use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 1989, 10: 515-533

279. Hellweg R and Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J. Neurosci. Res.* 1990; 26: 258-267
280. Hellweg R, Raivich G, Hartung HD, Hock C and Kreutzberg GW. Axonal transport of endogenous nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy. *Exp. Neurol.* 1994; 130: 24-30
281. Hempstead BL, Schleifer LS and Chao MV. Expression of functional nerve growth factor receptors after gene transfer. *Science* 1989; 243: 373-376
282. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF and Chao MV. High-affinity NGF binding requires coexpression of the *trk* proto-oncogene and the low affinity NGF receptor. *Nature* 1991; 350: 678-683
283. Hendry IA, Stöckel K, Thoenen H and Iversen LL. The retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain. Res.* 1974a; 68: 103-121
284. Hendry IA, Stach R and Herrup K. Characteristics of the retrograde axonal transport system of nerve growth factor in the sympathetic nervous system. *Brain. Res.* 1974b; 82: 117-128
285. Higgins GA, Koh S, Chen KS and Gaga FH. NGF induction of NGF receptor gene expression and cholinergic neuronal hypertrophy within the basal forebrain of the adult rat. *Neuron* 1989; 3: 247-256
286. Hirohata S and Miyamoto T. Elevated levels of interleukin-6 in cerebrospinal fluid from patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 644-649
287. Hofman H-D and Unsicker K. The seminal vesicle of the bull: a new and very rich source of nerve growth factor. *Eur. J. Biochem.* 1982; 128: 421-426
288. Hogue-Angeletti RA, Frazier WA, Jacobs JW, Niall HD and Bradshaw RA. Purification, characterization and partial amino acid sequence of nerve growth factor from cobra venom. *Biochem.* 1976; 15: 26-34
289. Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen C-K, Valletta JS, Zhou J, Long JB and Mobley WC. p140 *trk* mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that *trk* gene expression is induced by NGF. *Neuron* 1992; 9: 465-478
290. Holtzman DM, Li Y, Chen K, Gage FH, Epstein CJ and Mobley WC. Nerve growth factor reverses neuronal atrophy in a Down syndrome model of age-related neuro-degeneration. *Neurology* 1993; 43: 2668-2673
291. Holtzman DM, Kilbridge J, Li Y, Cunningham ET Jr, Lenn NJ, Clary DO, Reichardt LF and Mobley WC. *TrkA* expression in the CNS: evidence for the existence of several novel NGF-responsive CNS neurons. *J. Neurosci.* 1995; 15: 1567-1576
292. Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1992; 121: 49-146
293. Horigome K, Pryor JC, Bullock ED and Johnson EM Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor, neurotrophin specificity and receptor mediation. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 14881-14887
294. Horigome K, Bullock ED and Johnson EM Jr. Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 2695-2702
295. Hory-Lee F, Russell M, Lindsay RM and Frank E. Neurotrophin-3 supports the survival of developing muscle sensory neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 2613-2617
296. Hosoya M, Onda H, Ogi K, Masuda Y, Miyamoto Y, Ohtaki T, Okazaki H, Arimura A and Fujino M. Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 194: 133-143
297. Huff K, End D and Guroff G. Nerve growth factor-induced alteration in the response of PC12 pheochromocytoma cells to epidermal growth factor. *J. Cell. Biol.* 1981, 88: 189-198

298. Hægerstrand A, Jonzon B, Dalsgaard CJ and Nilsson J. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86: 5993-5996
299. Hægerstrand A, Dalsgaard CJ, Jonzon B, Larsson O and Nilsson J. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 3299-3303
300. Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Patella V, Lo Bianco G and Lapadula G. Increased expression of nerve growth factor (NGF) and high affinity NGF receptor (p140 TrkA) in human osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatol.* 2002; 41: 1413-1418
301. Iannone F and Lapadula G. The pathophysiology of osteoarthritis. *Aging Clin. Exp. Res.* 2003; 15: 364-372
302. Ibáñez CF, Ebendal T, Barbany G, Murray-Rust J, Blundell TL and Persson H. Disruption of the low affinity receptor-binding site in NGF allows neuronal survival and differentiation by the binding to the trk gene product. *Cell* 1992; 69: 329-341
303. Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, Greene LA, Barbacid M and Yancopoulos GD. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron* 1993; 10: 137-149
304. Isackson PJ and Bradshaw RA. The α -subunit of mouse 7S nerve growth factor is an inactive serine protease. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 5380-5383
305. Isackson PJ, Nisco SJ and Bradshaw RA. Expression of the α -subunit of 7S nerve growth factor in the mouse submandibular gland. *Neurochem. Res.* 1987; 12: 959-966
306. Isackson PJ, Ullrich A and Bradshaw RA. Mouse 7S nerve growth factor: complete sequence of a cDNA coding for the α -subunit precursor and its relationship to serine proteases. *Biochem.* 1984; 23: 5997-6002
307. Ishida-Yamamoto A, Senba E and Tohyama M. Distribution and fine structure of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive nerve fibers in the rat skin. *Brain Res.* 1989; 491: 93-101
308. Jackson HC 2nd, Winkelmann RK and Bickel WH. Nerve endings in the human lumbar spinal column and related structures. *J. Bone Joint Surg.* 1966; 48: 1272-1281
309. Jakobsen J, Brimijoin S, Skau K, Sidenius P and Wells D. Retrograde axonal transport of transmitter enzymes, fucose-labeled protein, and nerve growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes* 1981; 30: 797-803
310. Jancsó N, Jancsó-Gábor A and Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 1967; 31: 138-151
311. Jansen I, Uddman R, Hocherman M, Ekman R, Jensen K, Olesen J, Stiernholm P and Edvinsson L. Localization and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, substance P, and calcitonin gene-related peptide in human temporal arteries. *Ann. Neurol.* 1986; 20: 496-501
312. Jansen I, Uddman R, Ekman R, Olesen J, Ottosson A and Edvinsson L. Distribution and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, substance P, and calcitonin gene-related peptide in human middle meningeal arteries: comparison with cerebral and temporal arteries. *Peptides* 1992; 13: 527-536
313. Jarvis CR, Xiong ZG, Plant JR, Churchill D, Lu WY, MacVicar BA and MacDonald JF. Neurotrophin modulation of NMDA receptors in cultured murine and isolated rat neurons. *J. Neurophysiol.* 1997; 78: 2363-2371
314. Jelsma JN and Aguayo AJ. Trophic factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1994; 4: 717-725
315. Jing S, Tapley P and Barbacid M. Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron.* 1992; 9: 1067-1079
316. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW and Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell.* 1996; 85: 1113-1124
317. Jockers-Scherübl MC, Zouboulis CC, Boegner F and Hellweg R. Is nerve growth factor a serum marker for neurological and psychiatric complications in Behçet's disease? *Lancet* 1996; 347: 982

318. Johansson O and Madsen K. Stimulative effect of somatostatin on cell proliferation in cultured chondrocytes. *Med. Biol.* 1987; 65: 57-60
319. Johansson O and Liang Y. Neurotrophins and their receptors in the skin: a tribute to Rita Levi-Montalcini. *Biomed. Rev.* 1999; 10: 15-23
320. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M and Chao M. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986; 47: 545-554
321. Johnson D and Krenger W. Interactions of mast cells with the nervous system – recent advances. *Neurochem. Res.* 1992; 17: 939-951
322. Johnston MV, Rutkowski JL, Wainer BH, Long JB and Mobley WC. NGF effects on developing forebrain cholinergic neurons are regionally specific. *Neurochem. Res* 1987; 12: 985-994
323. Jongsma Wallin H, Danielsen N, Johnston JM, Gratto KA, Karchewski LA and Verge VMK. Exogenous NT-3 and NGF differentially modulate PACAP expression in adult sensory neurons, suggesting distinct roles in injury and inflammation. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 14: 267-282
324. Jongsma Wallin, H, Pettersson LME, Verge VMK and Danielsen N. Effect of anti-nerve growth factor treatment on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide expression in adult sensory neurons exposed to adjuvant induced inflammation. *Neurosci.* 2003; 120: 325-331
325. Jongstra-Bilen J, Coblenz L and Shooter EM. The in vitro processing of the NGF precursors by the γ -subunit of the 7S NGF complex. *Mol. Brain Res.* 1989, 5: 159-169
326. Joyce TJ, Yood RA and Carraway RE. Quantitation of substance-P and its metabolites in plasma and synovial fluid from patients with arthritis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77: 632-637
327. Jänig W, Levine JD and Michaelis M. Interaction of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. In *Progress in Brain Research*, Vol. 113. Kumazawa T, Kruger L and Mizumara K, Eds.: 1996; 161-184. Elsevier Science BV, Amsterdam
328. Kahaleh BM and Matucci-Cerinic M. Raynaud`s phenomenon and scleroderma. Dysregulated neuroendothelial control of vascular tone. *Athrit. Rheum.* 1995; 38: 1-4
329. Kanda N and Watanabe S. Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 121: 570-577
330. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M and Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1995; 20: 2373-2378
331. Kannan Y, Ushio H, Koyama H, Okada M, Oikawa M, Yoshihara T, Kaneko M and Matsuda H. 2.5S Nerve growth factor enhances survival , phagocytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood* 1991; 77: 1320-1325
332. Kannan Y, Usami K, Okada M, Shimizu S and Matsuda H. Nerve growth factor suppresses apoptosis of murine neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1992; 186: 1050-1056
333. Kannan Y, Matsuda H, Ushio H, Kawamoto K and Shimada Y. Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993; 102: 362-367
334. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV and Parada LF. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 1991a; 252: 554-558
335. Kaplan DR, Martin-Zanca D and Parada LF. Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 1991b; 350: 158-160
336. Karchewski LA, Gratto KA, Wetmore C and Verge VMK. Dynamic patterns of BDNF expression in injured sensory neurons: differential modulation by NGF and NT-3. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16: 1449-1462
337. Kennedy JC, Alexander IJ and Hayes KC. Nerve supply of the human knee and its functional importance. *Am. J. Sports Med.* 1982; 10: 329-335

338. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DLH, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton SB, McMahon SB and Thompson SWN. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.* 1999; 19: 5138-5148
339. Kidd BL, Mapp PI, Gibson SJ, Polak JM, O'Higgins F, Buckland-Wright JC and Blake DR. A neurogenic mechanism for symmetrical arthritis. *Lancet* 1989; 2: 1128-1130
340. Kikuchi T, Sakuta T and Yamaguchi T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6: 177-186
341. Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Kusunoki T, Hosoi S and Mikawa H. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* 1991; 21: 137-141
342. Kimball ES, Perisco FJ and Vaught JL. Substance P, neurokinin A, and neurokinin B induce generation of IL-1-like activity in P388D1 cells. *J. Immunol.* 1988; 141: 3564-3569
343. Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E and Barbacid M. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell.* 1991a; 65: 189-197
344. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF and Barbacid M. The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991b; 66: 395-403
345. Klein R, Lamballe F, Bryant S and Barbacid M. The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron* 1992; 8: 947-956
346. Klimiuk PA, Goronzy JJ, Björnsson J, Beckenbaugh RD and Weyand CM. Tissue cytokine patterns distinguish variants of rheumatoid synovitis. *Am. J. Pathol.* 1997; 151: 1311-1319
347. Knüsel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K and Hefti F. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88: 961-965
348. Koch AE. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:951-962
349. Koff WC and Dunegan MA. Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. *J. Immunol.* 1985; 135: 350-354
350. Koh S and Higgins GA. Differential regulation of the low-affinity nerve growth factor receptor during postnatal development of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1991; 313: 494-508
351. Koizumi S, Contreras ML, Matsuda Y and Hama T. K-252a: a specific inhibitor of the action of nerve growth factor on PC12 cells. *J. Neurosci* 1988; 8: 715-721
352. Koliatsos VE, Nauta HJW, Clatterbuck RE, Holtzmann DM, Mobley WC and Price DL. Mouse nerve growth factor prevents degeneration of axotomized basal forebrain cholinergic neurons in monkey. *J. Neurosci.* 1990; 10:3801-3813
353. Kordower JH, Gash DM, Bothwell M, Hersh L and Mufson EJ. Nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase remain colocalized in the nucleus basalis (Ch4) of Alzheimer's patients. *Neurobiol. Aging* 1989, 10: 67-74
354. Korsching S. and Thoenen H. Quantitative demonstration of retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 1983; 39: 1-4
355. Korsching S. The role of NGF in the CNS. *Trends. Neurosci* 1986; 9: 570-573
356. Korsching S and Thoenen H. Two-site enzyme immunoassay for nerve growth factor. *Methods Enzymol.* 1987; 47: 167-185
357. Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J. Neurosci.* 1993; 13: 2739-2748
358. Kromer LF. Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 1987; 235: 214-216
359. Kubes P and Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32: 699-708

360. Kuraishi Y, Nanayama T, Ohno H, Fujii N, Otaka A, Yajima H and Satoh M. Calcitonin gene-related peptide increases in the dorsal root ganglia of adjuvant arthritic rat. *Peptides* 1989; 10: 447-452
361. Kähler CM, Sitte BA, Reinisch N and Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 249: 281-286
362. Lahtinen T, Soinila S and Lakshmanan J. Biological demonstration of nerve growth factor in the rat pituitary gland. *Neurosci.* 1989; 30: 165-170
363. Lakshmanan J, Burns C and Smith RA. Molecular forms of nerve growth factor in mouse submaxillary glands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 152: 1008-1014
364. Lakshmanan J, Beattie GM, Hayek A, Burns C and Fisher DA. Biological actions of 53 kDa nerve growth factor as studied by a blot and culture technique. *Neurosci. Lett.* 1989; 99: 263-267
365. Lamballe F, Klein R and Barbacid M. TrkC, a new member of the trk family of tyrosin protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 967-979
366. Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Bonini S, Starace G, D'Elia MM, De Carli M and Aloe L. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high affinity nerve growth factor receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1997; 100: 408-414
367. Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G and Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N.Engl. J. Med.* 1998a; 338: 1174-1180
368. Lambiase A, Bonini S, Micera A, Rama P, Bonini S and Aloe L. Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998b; 39: 1272-1275
369. Lang E, Novak A, Reeh PW and Handwerker HO. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J. Neurophysiol.* 1990; 63: 887-901
370. Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundeberg T and Theodorsson E. Immunoreactive tachykinins, calcitonin gene-related peptide and neuropeptide Y in human synovial fluid from inflamed knee joints. *Neurosci. Lett.* 1989; 100: 326-330
371. Larsson J, Ekblom A, Henriksson K, Lundeberg T and Theodorsson E. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 1991; 20: 326-335
372. Laskin D, Heck DE and Laskin DL. Multifunctional role of nitric oxide in inflammation. *Trends Endocrinol. Metab.* 1994; 5: 377-382
373. Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 1995; 64: 113-139
374. Laurenzi MA, Persson MAA, Dalsgaard CJ and Ringdén O. Stimulation of human B lymphocyte differentiation by the neuropeptides substance P and neurokinin. *Scand. J. Immunol.* 1989; 30: 695-702
375. Le JM and Vilcek J. Interleukin-6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute protein response. *Lab. Invest.* 1989; 61: 588-602
376. Lee R, Kermani P, Teng KK and Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 2001; 294: 1945-1948
377. Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H and Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989; 341: 149-152
378. Lembeck F. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1953; 219: 197-213
379. Lembeck F and Hozer P. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1979; 310: 175-183

380. Lembeck F, Donnerer J and Colpaert FC. Increase of substance P in primary afferent nerves during chronic pain. *Neuropeptides* 1981; 1: 175-180
381. Lembeck F. Substance P: The 1988 Ulf Euler lecture. From extract to excitement. *Acta. Physiol. Scand.* 1988, 133: 435-454
382. Leon A, Burianni A, Dal Toso R, Fabris M, Romanello S, Aloe L and Levi-Montalcini R. Mast cells synthesize, store and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 3739-3743
383. Leslie TA, Emson PC, Dowd PM and Woolf CJ. Nerve growth factor contributes to the upregulation of GAP-43 and peptotachykinin A mRNA in primary sensory neurons following peripheral inflammation. *Neurosci* 1995; 67: 753-761
384. Levi-Montalcini R and Hamburger V. Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 1951; 116: 321-361
385. Levi-Montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1952; 55: 330-343
386. Levi-Montalcini R and Angeletti PU. The nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 1968; 48: 534-569
387. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987; 237: 1154-1162
388. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA and Basbaum AI. Intra-neuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226: 547-549
389. Levine JD, Moskowitz MA and Basbaum AI. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. *J. Immunol* 1985; 135: 843s-847s
390. Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C and Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J. Neurosci.* 1986; 6: 3423-3429
391. Lewin GR and Mendell LM. Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci.* 1993; 16: 353-359
392. Lewin GR, Ritter AM and Mendell LM. Nerve growth factor-induced hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci.* 1993; 13: 2136-2148
393. Lewin GR, Rueff A and Mendell LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur. J. Neurosci.* 1994; 6: 1903-1912
394. Lewin GR and Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Ann. Rev. Neurosci.* 1996; 19: 289-317
395. Lewis T. The blood vessels of the human skin and their responses. Shaw and Sons, London 1927
396. Lewis T. Experiments relating to cutaneous hyperalgesia and its spread through somatic nerves. *Clin. Sci.* 1936; 2: 373-423
397. Liberini P and Cuello AC. Effects of nerve growth factor in primate models of neurodegeneration: potential relevance in clinical neurology. *Rev. Neurosci.* 1994; 5: 89-104
398. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS and Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6348-6352
399. Lin CY, Lin CC, Hwang B and Chiang BN. Cytokines predict coronary aneurysm formation in Kawasaki disease patients. *Eur. J. Pediatr.* 1993; 152: 309-312
400. Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET III, Vannice JL and Collins F. Purification, cloning and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 1989; 246: 1023-1025
401. Lin LF, Armes LG, Sommer A, Smith DJ and Collins F. Isolation and characterization of ciliary neurotrophic factor from rabbit sciatic nerves. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 8942-8947
402. Lin Q, Wu J and Willis WD. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J. Neurophysiol.* 1999; 82: 2602-2611
403. Lindholm D, Heumann R, Meyer M and Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of the rat sciatic nerve. *Nature* 1987; 330: 658-659

404. Lindsay RM and Harmer AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptides genes in adult sensory neurons. *Nature* 1989; 337: 362-364
405. Lindsay RM, Lockett C, Sternberg J and Winter J. Neuropeptide expression in cultures of adult rat sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neurosci* 1989; 33: 53-65
406. Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA and DiStefano PS. Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* 1994; 17: 182-190
407. Liuzzi FJ, Scoville SA and Bufton SM. Effects of short-term estrogen replacement on *trkA* mRNA levels in axotomized dorsal root ganglion neurons. *Exp. Neurol.* 1999; 159: 433-440
408. Loeb DM, Maragos J, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF and Greene LA. The *trk* proto-oncogene rescues NGF responsiveness in mutant NGF-nonresponsive PC12 cell lines. *Cell* 1991; 66: 961-966
409. Loeb DM and Greene LA. Transfection with *trk* restores "slow" NGF binding, efficient NGF uptake, and multiple NGF responses to NGF-nonresponsive PC12 cell mutants. *J. Neurosci* 1993; 13: 2919-2929
410. Lotz M, Carson DA and Vaughan JH. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: Neural pathway in pathogenesis of arthritis. *Science* 1987; 235: 893-895
411. Lotz M, Vaughan JH and Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 241: 1218-1221
412. Luppi P, Levi-Montalcini R, Bracci-Laudiero L, Bertolini A, Arletti R, Tavernari D, Vigneti E and Aloe L. NGF is released into plasma during human pregnancy: an oxytocin-mediated response? *Neuroreport* 1993; 4: 1063-1065
413. Lygren I, Ostensen M, Burhol PG and Husby G. Gastrointestinal peptides in serum and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. *Ann. Rheum. Dis.* 1986; 45: 637-640
414. MacPhee IM and Barker PA. Brain-derived neurotrophic factor binding to the p75 neurotrophin receptor reduces TrkA signalling while increasing serine phosphorylation in the TrkA intracellular domain. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23547-23551
415. Macchioni P, Boiardi L, Meliconi R, Pulsatelli L, Maldini MC, Ruggeri R, Facchini A and Salvarani C. Serum chemokines in patients with psoriatic arthritis treated with cyclosporin A. *J. Rheumatol.* 1998; 25: 320-325
416. Madden KS and Felten DL. Experimental basis for neural-immune interactions. *Physiol. Rev.* 1995; 75: 77-106
417. Maestripieri D, De Simone R, Aloe L and Alleva E. Social status and nerve growth factor serum levels after agonistic encounters in mice. *Physiol. Behav.* 1990; 47: 161-164
418. Maggi CA. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J. Auton. Pharmacol.* 1991; 11: 173-208
419. Maggi E, Biswas P, Del Prete G, Parronchi P, Macchia D, Simonelli C, Emmi L, De Carli M, Tiri A, Ricci M, et al.: Accumulation of TH2-like helper cells in the conjunctiva of patients with vernal keratoconjunctivitis. *J. Immunol.* 1991; 146: 1169-1174
420. Maggio JE. Tachykinins. *Ann. Rev. Neurosci.* 1988; 11: 13-28
421. Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV and Hempstead BL. High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140*trk* binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 6884-6891
422. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM and Yancopoulos GD. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* 1990; 247(4949 Pt1): 1446-1451
423. Majdan M, Lachance C, Gloster A, Aloyz R, Zeindler C, Bamji S, Bhakar A, Belliveau D, Fawcett J, Miller FD and Barker PA. Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 1997; 17: 6988-6998

424. Malinsky J. The ontogenetic development of nerve terminals in the intervertebral disc of man. *Acta. Anat.* 1959; 38: 96-113
425. Mallett S and Barclay AN. A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunol. Today* 1991; 12: 220-223
426. Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE and Metcalfe DD. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum.* 1986; 29: 956-963
427. Malone DG, Wilder RL, Saavedra-Delgado AMS and Metcalfe DD. Mast cell numbers in rheumatoid synovial tissues. Correlations with quantitative measures of lymphocytic infiltration and modulation by anti-inflammatory therapy. *Arthr. Rheum.* 1987; 30: 130-137
428. Malone DG and Metcalfe DD. Mast cell and arthritis. *Ann. Allergy* 1988; 61(6 Pt 2): 27-30
429. Mamidipudi V and Wooten MW. Dual role for p75NTR signaling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J. Neurosci. Res.* 2002; 68: 373-384
430. Manni L and Aloe L. Role of IL-1 β and TNF- β in the regulation of NGF in experimentally induced arthritis in mice. *Rheumatol. Int.* 1998; 18: 97-102
431. Manni L, Lundeberg T, Fiorito S, Bonini S, Vigneti E and Aloe L. Nerve growth factor release by human synovial fibroblasts prior to and following exposure to tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and cholecystokinin-8: the possible role of NGF in the inflammatory response. *Clin. Exp. Rheum.* 2003; 21: 617-624
432. Manning PT, Russell JH, Simmons B and Johnson EM Jr. Protection from guanethidine-induced neuronal destruction by nerve growth factor: effect of NGF on immune function. *Brain Res.* 1985; 340: 61-69
433. Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA and Woolf CJ. Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 9385-9390
434. Marabini S, Matucci-Cerinic M, Geppetti P, Del Bianco E, Marchesoni A, Tosi S, Cagnoni M and Partsch G. Substance P and somatostatin levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and psoriatic arthritis synovial fluid *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1991; 632: 435-436
435. Marlier L, Poulat P, Rajaofetra N and Privat A. Modifications of serotonin-, substance P- and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in the dorsal horn of the spinal cord of arthritic rats: a quantitative immunocytochemical study. *Exp. Brain Res.* 1991; 85: 482-490
436. Marshall KW, Chiu B and Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum.* 1990; 33: 87-90
437. Martinez C, Delgado M, Pozo D, Leceta J, Calvo JR, Ganea D and Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulate endotoxin-induced IL-6 production by murine peritoneal macrophages. *J. Leuko. Biol.* 1998; 63: 591-601
438. Martinou J-C, Martinou I and Kato AC. Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro. *Neuron* 1992; 8: 737-744
439. Matsuda H, Coughlin MD, Bienenstock J and Denburg JA. Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 6508-6512
440. Matsuda H, Kawakita K, Kiso Y, Nakano T and Kitamura Y. Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J. Immunol.* 1989; 142: 927-931
441. Matucci-Cerinic M, Lotti T, Cappugi P, Boddi V, Fattorini L and Panconesi E. Somatostatin treatment of psoriatic arthritis. *Int. J. Dermatol.* 1988; 27: 56-58
442. Matucci-Cerinic M, Pignone A, Lotti T, Partsch G, Livi R and Cagnoni M. Gold salts and somatostatin: a new combined analgesic treatment for psoriatic arthritis. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1992; 18: 53-61
443. Matucci-Cerinic M, Kahaleh BM and LeRoy EC. The vascular involvement in systemic scleroderma. In: Furst, D., Clements, P. eds. *Systemic sclerosis*. Philadelphia: Lea and Febiger 1995; 513-574

444. Matucci-Cerinic M, Giacomelli R, Pignone A, Cagnoni ML, Generini S, Casale R, Cipriani P, Del Rosso A, Tirassa P, Konttinen YT, Kahaleh BM, Fan P-S, Paoletti M, Marchesi C, Cagnoni M and Aloe L. Nerve growth factor and neuropeptides circulating levels in systemic sclerosis (scleroderma). *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60: 487-494
445. Mazurek N, Weskamp G, Erne P and Otten U. Nerve growth factor induces mast cell degranulation without changing intracellular calcium levels. *FEBS Lett.* 1986;198: 315-320
446. McGovern UB, Jones KT and Sharpe GR. Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 1995; 132: 892-896
447. McMahon SB, Lewin GR and Wall PD. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1993; 3: 602-610
448. McMahon SB, Armanini MP, Ling LH and Phillips HS. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron* 1994; 12: 1161-1171
449. McMahon SB, Bennett DLH, Priestly JV and Shelton DL. The biological effects of endogenous nerve growth factor on adult sensory neurons revealed by trkA-IgG fusion molecule. *Nat. Med.* 1995; 1: 774-780
450. McNeill DL, Coggeshall RE and Carlton SM. A light and electron microscopic study of calcitonin gene-related peptide in the spinal cord of the rat. *Exp. Neurol.* 1988; 99: 699-708
451. McNeill DL, Westlund KN and Coggeshall RE. Peptide immunoreactivity of unmyelinated primary afferent axons in rat lumbar dorsal roots. *J. Histochem. Cytochem.* 1989; 37: 1047-1052
452. Meakin SO and Shooter EM. The nerve growth factor family of receptors. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 323-331
453. Meier R, Becker-André M, Götz R, Heumann R, Shaw A and Thoenen H. Molecular cloning of bovine and chick nerve growth factor (NGF): delineation of conserved and unconserved domains and their relationship to the biological activity and antigenicity of NGF. *EMBO. J.* 1986; 5: 1489-1493
454. Melamed I, Kelleher CA, Franklin RA, Brodie C, Hempstead B, Kaplan D and Gelfand EW. Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocyte is mediated by gp 140 trk. *Eur. J. Immunol* 1996; 26: 1985-1992
455. Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M and Schmidt RF. Calcitonin gene-related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995; 73: 1020-1024
456. Mican JM and Metcalfe DD. Arthritis and mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990; 86(4 Pt 2): 677-683
457. Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DLH, Yan Q and Priestley JV. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J. Neurosci.* 1997; 17: 8476-8490
458. Michel T and Feron O. Nitric oxide synthase: which, where, how, and why. *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2146-2152
459. Miller FD, Mathew TC and Toma JG. Regulation of nerve growth factor receptor gene expression by nerve growth factor in the developing peripheral nervous system. *J. Cell. Biol.* 1991; 112: 303-312
460. Mione MC, Ralevic V and Burnstock G. Peptides and vasomotor mechanisms. *Pharmacol. Ther.* 1990; 46: 429-468
461. Mischel PS, Smith SG, Vining ER, Valletta JS, Mobley WC and Reichardt LF. The extracellular domain of p75NTR is necessary to inhibit neurotrophin-3 signaling through trkA. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 11294-11301
462. Mitsiadis TA, Wroblewski J, Urdiales JL, Becker E, Martin-Zanca D, Rudkin BB and Lendahl U. Expression of Trk receptors during cartilage differentiation. *Ann. NY Acad. Sci.* 1996; 785: 298-300
463. Miyasaka N and Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci.* 1997; 61: 2073-2081

464. Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Buchanan K and Johnston MV. Choline acetyltransferase activity in striatum of neonatal rats increased by nerve growth factor. *Science* 1985; 229: 284-287
465. Mobley WC, Rutkowski JL, Tennekoon GI, Gemski J, Buchanan K and Johnston HV. Nerve growth factor increases choline acetyltransferase activity in developing basal forebrain neurons. *Brain Res.* 1986; 387: 53-62
466. Moilanen E and Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.* 1995; 27: 359-367
467. Moller K, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddmann R and Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neurosci.* 1993; 57: 725-732
468. Molnar M, Ruberti F, Cozzari C, Domenici L and Cattaneo A. A critical period in the sensitivity of basal forebrain cholinergic neurons to NGF deprivation. *Neuroreport* 1997; 8: 575-579
469. Molnar M, Tongiorgi E, Avignone E, Gonfloni S, Ruberti F, Domenici L and Cattaneo A. The effects of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies on developing basal forebrain neurons are transient and reversible. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10: 3127-3140
470. Moore JB Jr, Mobley WC and Shooter EM. Proteolytic modification of the β -nerve growth factor protein. *Biochem.* 1974; 13: 833-840
471. Morrison RS, Kornblum HI, Leslie FM and Bradshaw RA. Trophic stimulation of cultured neurons from neonatal rat brain by epidermal growth factor. *Science* 1987; 238: 72-75
472. Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann. Neurol.* 1984; 16:157-168
473. Mu X, Silos-Santiago I, Carroll SL and Snider WD. Neurotrophin receptor genes are expressed in distinct patterns in developing dorsal root ganglia. *J. Neurosci.* 1993; 13: 4029-4041
474. Murase K, Furukawa Y, Iwane M and Hayashi K. Development of sensitive enzyme immunoassay for human nerve growth factor. *Biochem. Intern.* 1991; 25: 29-34
475. Murase K, Takeuchi R, Iwata E, Furukawa Y, Furukawa S and Hayashi K. Developmental changes in nerve growth factor level in rat serum. *J. Neurosci. Res.* 1992; 33: 282-288
476. Murphy M, Reid K, Hilton DJ and Bartlett PF. Generation of sensory neurons is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 3498-3501
477. Murphy RA, Chlumecky V, Smilie LB, Carpenter M, Natriss M, Anderson JK, Rhodes JA, Barker PA, Siminoski K, Campenot RB and Haskins J. Isolation and characterization of a glycosylated form of beta nerve growth factor in mouse submandibular glands. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 12504-12509
478. Nakamura M, Toyoda M and Morohashi M. Pruritogenic mediators in psoriasis vulgaris: comparative evaluation of itch-associated cutaneous factors. *Br. J. Dermatol.* 2003; 149: 718-730
479. Naukkarinen A, Nickoloff BJ and Farber EM. Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 92: 126-129
480. Near SL, Whalen LR, Miller JA and Ishii DN. Insulin-like growth factor-II stimulates motor nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1992; 89: 11716-11720
481. Neely EK, Beukers MW, Oh Y, Cohen P and Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor receptors. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 1991; 372: 116-123
482. Nguyen CB, Harris L, Szönyi É, Baughman SA, Hale VG, Dybdal NO, Sadick MD and Escandón E. Tissue disposition and pharmacokinetics of recombinant human nerve growth factor after acute and chronic subcutaneous administration in monkeys. *Drug Metabol. Dis.* 2000, 28: 598-607
483. Nichols RA and Shooter EM. Characterization of the differential interaction of the microheterogeneous forms of the γ subunit of 7S nerve growth factor with natural and synthetic ligands. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 10296-10303
484. Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Törnwall J and Kontinen YT. Neuropeptides in experimental and degenerative Arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 966: 384-399

485. Nitta A, Ogihara Y, Onishi J, Hasegawa T, Furukawa S and Nabeshima T. Oral administration of propentofylline, a stimulator of nerve growth factor (NGF) synthesis, recovers cholinergic neuronal dysfunction induced by the infusion of anti-NGF antibody into the rat septum. *Behav. Brain Res.* 1997; 83: 201-204
486. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS and Jacobsen C. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature* 2004; 427: 843-848
487. Näher-Noé M, Gnahn H, Grundler A, Klingelhöfer J, Weindl A and Conrad B. Determination of nerve growth factor concentrations in human samples by two-site immunoenzymometric assay and bioassay. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1993; 31: 375-380
488. Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, Yi D, Fukuoka T, Hashimoto N, Yonenobu K, Yoshikawa H and Noguchi K. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. *Pain* 2002; 99: 121-132
489. Ohlen A, Thureson-Klein A, Lindbom L, Persson MG and Hedqvist P. Substance P activates leukocytes and platelets in rabbit microvessels. *Blood vessels* 1989; 26: 84-94
490. Ojeda SR, Hill DF and Katz KH. The genes encoding nerve growth factor and its receptor are expressed in the developing female rat hypothalamus. *Mol. Brain Res.* 1991; 9: 47-55
491. Olson L, Backlund EO, Ebendal T, Freedman R, Hamberger B, Hansson P, Hoffer B, Lindblom U, Meyerson B, Strömberg I, Sydow O and Seiger Å. Intrapataminal infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson`s disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch. Neurol.* 1991; 48: 373-381
492. Olsson Y. Mast cells in plaques of multiple sclerosis. *Acta. Neurol. Scand.* 1974; 50: 611-618
493. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1991; 14: 453-501
494. Otten U, Baumann JB and Girard J. Stimulation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Nature* 1979; 282: 413-414
495. Otten U, Baumann JB and Girard J. Nerve growth factor induces plasma extravasation in rat skin. *Eur. J. Pharmacol.* 1984; 106: 199-201
496. Otten U. Nerve growth factor and peptidergic sensory neurons. *Trends Pharmacol. Sci.* 1984; 5: 307-310
497. Otten U, Ehrhard P. and Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 10059-10063
498. Otten U, Boeckh C, Ehrhard P, Gadiant RA and Frankenberg M. Molecular mechanisms of nerve growth factor biosynthesis in rat central nervous system. , in: Kerwitz, H., Thomson, T. and Bickel, U. (eds), *Pharmacological interventions on central cholinergic mechanisms in senile dementia (Alzheimer`s Disease)*, Zuckschwerdt Verlag München, Bern, Wien, San Francisco, pp.20-27
499. Otten U, Scully JL, Ehrhard PB and Gadiant RA. Neutrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog. Brain Res.* 1994; 103: 293-305
500. Owolabi JB, Rizkalla G, Tehim A, Ross GM, Riopelle RJ, Kamboj R, Ossipov M, Bian D, Wegert S, Porreca F and Lee DKH. Characterization of antiallostatic actions of ALE-0540, a novel nerve growth factor receptor antagonist, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 1271-1276
501. Pan Z and Perez-Polo R. Increased uptake of L-cysteine and L-cystine by nerve growth factor in rat pheochromocytoma cells. *Brain. Res.* 1996; 740: 21-26
502. Pan Z and Perez-Polo R. Role of nerve growth factor in oxidant homeostasis: glutathione metabolism. *J. Neurochem.* 1993; 61: 1713-1721
503. Pan Z and Perez-Polo R. Regulation of gama-glutamylcysteine synthetase activity by nerve growth factor. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1996; 14: 559-566
504. Paran D, Elkayam O, Mayo A, Paran H, Amit M, Yaron M and Caspi D. A pilot study of a long acting somatostatin analogue for the treatment of refractory rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2001; 60: 888-891

505. Payan DG and Goetzl EJ. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.* 1985; 135(2 Suppl): 783s-786s
506. Payan DG, Hess CA and Goetzl EJ. Inhibition by somatostatin of the proliferation of T-lymphocytes and Molt-4 lymphoblasts. *Cell Immunol.* 1984; 84: 433-438
507. Pearce FL and Thompson HL. Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor. *J. Physiol.* 1986; 372: 379-393
508. Peng S, Wu J, Mufson EJ and Fahnstock M. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 641-649
509. Pernow B. Substance P. *Pharmacol. Rev.* 1983; 35: 85-141
510. Pernow B. Role of tachykinins in neurogenic inflammation. *J. Immunol.* 1985; 135: 812s-815s
511. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsmann M, Sinicropi D, Burton LE and Peroutka SJ. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann. Neurol.* 1994; 36: 244-246
512. Peunova N and Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 1995; 375: 68-73
513. Piga M, Passiu G, Carta P, Satta L, Cherchi V, Pala R, Sanna G, Cauli A, Tuveri MA, Aloe L and Mathieu A. Increased pulmonary epithelial permeability in systemic sclerosis is associated with enhanced cutaneous nerve growth factor expression. *Eur. J. Int. Med.* 2000; 11: 156-160
514. Pincelli C, Seignani C, Manfredini R, Grande A, Fantini F, Bracci-Laudiero L, Aloe L, Ferrari S, Cossarizza A and Giannetti A. Expression and function of nerve growth factor and nerve growth factor receptor on cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 103: 13-18
515. Pincelli C, Haake AR, Benassi L, Grassilli E, Magnoni C, Ottani D, Polakowska R, Franceschi C and Giannetti A. Autocrine nerve growth factor protects human keratinocytes from apoptosis through its high affinity receptor (TRK): a role for BCL-2. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 109: 757-764
516. Piotrowski W and Foreman JC. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. *Br. J. Dermatol.* 1986; 114: 37-46
517. Pleasure SJ, Reddy UR, Venkatakrishnan G, Roy AK, Chen J, Ross AH, Trojanowski JQ, Pleasure DE and Lee VMY. Introduction of nerve growth factor (NGF) receptors into a medulloblastoma cell line results in expression of high- and low-affinity receptors but not NGF-mediated differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 8496-8500
518. Polak J and Bloom SR. Somatostatin localization in tissues. *Scand. J. Gastroenterol.* 1986; 119: 11-21
519. Poluha W, Schonhoff CM, Harrington KS, Lachyankar MB, Crosbie NE, Bulseco DA and Ross AH. A novel, nerve growth factor-activated pathway involving nitric oxide, p53, and p21WAF1 regulates neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 24002-24007
520. Pozza M, Guerra M, Manzini E and Calzà L. A histochemical study of the rheumatoid synovium: focus on nitric oxide, nerve growth factor high affinity receptor, and innervation. *J. Rheumatol.* 2000; 27: 1121-1127
521. Quasthoff S and Hartung HP. Nervenwachstumsfaktor (NGF) in der Behandlung der diabetischen Polyneuropathie. Eine Hoffnung weniger? *Nervenarzt* 2001; 72: 456-459
522. Quinlan KL, Song IS, Naik SM, Letran EL, Olerud JE, Bunnett NW, Armstrong CA, Caughman SW and Ansel JC. VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P. *J. Immunol.* 1999; 162: 1656-1661
523. Racke MM, Mason PJ, Johnson MP, Brankamp RG and Linnik MD. Demonstration of a second pharmacologically active promoter region in the NGF gene that induces transcription at exon 3. *Brain Res.* 1996; 41: 192-199
524. Radeke HH and Resch K. The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin. Invest.* 1992; 70: 825-842

525. Ralston HJ, Miller MR and Kasahara M. Nerve endings in human fasciae, tendons, ligaments, periosteum, and joint synovial membrane. *Anat. Rec.* 1960; 136: 137-147
526. Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, Stern A, Schwarz E and Rudolph R. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 3296-3303
527. Raud J, Lundeberg T, Brodda-Jansen G, Theodorsson E and Hedqvist P. Potent anti-inflammatory action of calcitonin gene-related peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 180: 1429-1435
528. Raychaudhuri SP and Farber EM. Are sensory nerves essential for the development of psoriasis lesions? *J. Am. Acad. Dermatol.* 1993; 28: 488-489
529. Raychaudhuri SP, Jiang W-Y and Farber EM. Psoriatic keratinocytes express high levels of nerve growth factor. *Acta. Dermatol. Venereol.* 1998; 78: 84-86
530. Raychaudhuri SP, Farber EM and Raychaudhuri SK. Role of nerve growth factor in RANTES expression by keratinocytes. *Acta. Derm. Venereol.* 2000a; 80: 247-250
531. Raychaudhuri SP, Jiang W-Y, Smoller BR and Farber EM. Nerve growth factor and its receptor system in psoriasis. *Br. J. Dermatol.* 2000b; 143: 198-200
532. Raychaudhuri SP, Dutt S, Raychaudhuri SK, Sanyal M and Farber EM. Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation. *Br. J. Dermatol.* 2001; 144: 931-939
533. Raychaudhuri SP and Raychaudhuri SK. Role of NGF and neurogenic inflammation in the pathogenesis of psoriasis. *Prog. Brain. Res.* 2004; 146: 433-437
534. Raychaudhuri SP, Sanyal M, Weltman H and Kundu-Raychaudhuri S. K252a, a high-affinity nerve growth factor receptor blocker, improves psoriasis: an in vivo study using the severe combined immunodeficient mouse-human skin model. *J. Invest. Dermatol.* 2004, 122: 812-819
535. Recio-Pinto E, Rechler MM and Ishii DN. Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J. Neurosci.* 1986; 6: 1211-1219
536. Regoli D, Boudon A and Fauchère JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev.* 1994; 46: 551-99
537. Reinshagen M, Geerling I, Eysselein VE, Adler G, Huff KR, Moore GP and Lakshmanan J. Commercial recombinant human beta-nerve growth factor and adult rat dorsal root ganglia contain an identical molecular species of nerve growth factor prohormone. *J. Neurochem.* 2000; 74: 2127-2133
538. Richardson BP, Engel G, Donatsch P and Stadler PA. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 1985; 316: 126-131
539. Rifkin DB and Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Biol.* 1989, 109: 1-6
540. Robak T, Gladalska A, Stepień H and Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Med. Inflamm.* 1998; 7: 347-353
541. Rodriguez-Tébar A, Dechant G and Barde Y-A. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron* 1990; 4: 487-492
542. Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW and Evans RM. Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* 1983; 304: 129-135
543. Rosenthal A, Goeddel DV, Nguyen T, Lewis M, Shih A, Laramée GR, Nikolics K and Winslow JW. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron* 1990; 4: 767-773
544. Ross AH, Grob P, Bothwell M, Elder DE, Ernst CS, Marano N, Ghrist BFD, Slemper CC, Herlyn M, Atkinson B and Koprowski H. Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 6681-6685

545. Rubin JS and Bradshaw RA. Isolation and partial amino acid sequence analysis of nerve growth factor from the guinea pig prostate. *J. Neurosci. Res.* 1981; 6: 451-464
546. Rueff A and Dray A. 5-Hydroxytryptamine-induced sensitization and activation of peripheral fibres in the neonatal rat are mediated via different 5-hydroxytryptamine-receptors. *Neurosci* 1992; 50: 899-905
547. Rueff A and Dray A. Pharmacological characterization of the effects of 5-hydroxytryptamine and different prostaglandins on peripheral sensory neurons in vitro. *Agents Actions* 1993; 38: C13-C15
548. Russell IJ, Orr MD, Littman B, Vipraio GA, Alboukrek D, Michalek JE, Lopez Y and MacKillip F. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum.* 1994; 37: 1593-1601
549. Saboori AM and Young M. Nerve growth factor: biosynthetic products of the mouse salivary glands. Characterization of stable high molecular weight and 32,000-dalton nerve growth factors. *Biochem.* 1986; 25: 5565-5571
550. Sakai Y, Hashimoto H, Shintani N, Tomimoto S, Tanaka K, Ichibori A, Hirose M and Baba A. Involvement of p38 MAP kinase pathway in the synergistic activation of PACAP mRNA expression by NGF and PACAP in PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 285: 656-661
551. Saldanha G, Hongo J, Plant G, Acheson J, Levy I and Anand P. Decreased CGRP, but preserved TrkA immunoreactivity in nerve fibres in inflamed human superficial temporal arteries. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999; 66: 390-392
552. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV, Muzaffar R, Kulig K, Gabellini N and Hochwald G. Nerve growth factor production by lymphocytes. *J. Immunol* 1994; 153: 4488-4495
553. Sato K and Sato F. Effect of VIP on sweat secretion and cAMP accumulation in isolated simian eccrine glands. *Am. J. Physiol.* 1987; 253: R935-R941
554. Satoh T, Nakamura S, Taga T, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T and Kaziro Y. Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor2/interleukin-6. *Mol. Cell. Biol.* 1988; 8: 3546-3549
555. Sawada M, Kondo N, Suzumura A and Marunouchi T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 1989; 491: 394-397
556. Scarborough DE. Somatostatin regulation by cytokines. *Metabolism* 1990; 39(9 Suppl 2): 108-111
557. Schall TJ: Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 1991; 3: 165-183
558. Schepelmann K, Messlinger K, Schaible HG and Schmidt RF. Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin E2. *Neurosci.* 1992; 50: 237-247
559. Schmauder-Chock EA and Chock SP. Localization of cyclo-oxygenase and prostaglandin E2 in the secretory granule of the mast cell. *J.Histochem. Cytochem.* 1989; 37: 1319-1328
560. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE and Ansel JC. Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune system. *Exp. Dermatol.* 1998; 7: 81-96
561. Schubert D, Heinemann S and Kidokoro Y. Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat nerve cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977; 74: 2579-2583
562. Schwarz H, Villiger PM, von Kempis J and Lotz M. Neuropeptide Y is an inducible gene in human immune system. *J. Neuroimmunol.* 1994; 51: 53-61
563. Schwarz MA, Fisher D, Bradshaw RA and Isackson PJ. Isolation and sequence of a cDNA clone of beta-nerve growth factor from guinea pig prostate gland. *J. Neurochem.* 1989; 52: 1203-1209
564. Scicchitano R, Bienenstock J and Stanisiz AM. In vivo immunomodulation by the neuropeptide substance P. *Immunology* 1988; 63: 733-735
565. Scott J, Selby M, Urdea M, Quiroga M, Bell GI and Rutter WJ. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the precursor of mouse nerve growth factor. *Nature* 1983; 302: 538-540

566. Scott SA and Crutcher KA. Nerve growth factor and Alzheimer`s disease. *Rev. Neurosci.* 1994; 5: 179-211
567. Sedel F, Béchade C and Triller A. Nerve growth factor (NGF) induces motor neuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 3904-3912
568. Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberté J, Lazure C, Chrétién M and Murphy RA. Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian protein convertases. *Biochem. J.* 1996; 314(Pt 3): 951-960
569. Seidel MF, März P, Seidel A, Storch M, Späth M, Otten U and Müller W. Nerve growth factor is increased in the cerebrospinal fluid of patients with spinal nerve compression. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62: 297
570. Seiler M and Schwab ME. Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus basalis in the rat. *Brain Res.* 1984; 300: 33-39
571. Selby MJ, Edwards R, Sharp F and Rutter WJ. Mouse nerve growth factor gene: structur and expression. *Mol. Cell. Biol.* 1987b; 7: 3057-3064
572. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H and Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 1992; 360: 757-759
573. Senger DL and Campenot RB. Rapid retrograde tyrosin phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J. Cell Biol.* 1997; 138: 411-421
574. Server AC and Shooter EM. Nerve growth factor. *Adv. Protein Chem.* 1977, 31: 339-409
575. Sher A and Coffman RL. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 1992; 10: 385-409
576. Siminoski K, Murphy RA, Rennert P and Heinrich G. Cortisone, testosterone, and aldosterone reduce levels of nerve growth factor messenger ribonucleic acid in L-929 fibroblasts. *Endocrinology* 1987; 121: 1432-1437
577. Skoff AM, Resta C, Swamydas M and Adler JE. Nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) regulate substance P release in adult sensory neurons. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 847-854
578. Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A, Long LK, Bryant S, Lewin A, Lira SA and Barbacid M. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature* 1994; 386: 246-249
579. Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM and Lee TH. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J. Immunol.* 1993; 151: 3274-3282
580. Sofroniew MV, Howe CL and Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Ann. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 1217-1281
581. Sohrabji F, Miranda RC and Toran-Allerand CD. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 1994; 14: 459-471
582. Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, Sung KJ, Armstrong CA and Ansel JC. Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp. Dermatol.* 2000; 9: 42-52
583. Spillantini MG, Aloe L, Alleva E, De Simone R, Goedert M and Levi-Montalcini R. Nerve growth factor mRNA and protein increase in hypothalamus in a mouse model of aggression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 8555-8559
584. Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Näher-Noe M and Thoenen H. Regulation of nerve growth factor synthesis in the rat central nervous system: comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 1990; 2: 69-76

585. Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, DiStefano PS and Yancopoulos GD. TrkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 1991; 65: 885-893
586. Stach RW and Shooter EM. The biological activity of cross-linked β nerve growth factor protein. *J. Biol. Chem.* 1974; 249: 6668-6674
587. Stach RW, Server AC, Pignatti P-F, Piltch A and Shooter EM. Characterization of the γ subunits of the 7S nerve growth factor complex. *Biochem.* 1976; 15: 1455-1461
588. Stanis AM, Befus ADE and Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J. Immunol.* 1986; 136: 152-156
589. Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY and Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1987; 84: 2975-2979
590. Stefanovic-Racic M, Stadler J, Georgescu HI and Evans CH. Nitric oxide synthesis and its regulation by rabbit synoviocytes. *J. Rheumatol.* 1994; 21: 1892-1898
591. Steiner P, Pfeilschifter J, Boeckh C, Radeke H and Otten U. Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha synergistically stimulate nerve growth factor synthesis in rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1991; 261(5 Pt 2): F792-F798
592. Stephani U, Sutter A and Zimmermann A. Nerve growth factor (NGF) in serum: Evaluation of serum NGF levels with a sensitive bioassay employing embryonic sensory neurons. *J. Neurosci. Res.* 1987; 17: 25-35
593. Stichtenoth DO and Frölich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37: 246-257
594. Strehlow D and Korn JH. Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1998; 10: 572-578
595. Stricker S: Untersuchungen über die Gefäßwurzel des Ischiadicus. *Ber. Akad. Wiss. Wien* 1876; 3: 173-185
596. Stöckel K, Schwab M and Thoenen H. Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain. Res.* 1975; 89: 1-14
597. Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D and Thoenen H. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 1989; 342: 920-923
598. Suda K, Barde YA and Thoenen H. Nerve growth factor in mouse and rat serum: correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 4042-4046
599. Sung CP, Arleth AJ, Aiyar N, Bhatnagar PK, Lysko PG and Feuerstein G. CGRP stimulates the adhesion of leukocytes to vascular endothelial cells. *Peptides* 1992; 13: 429-434
600. Sung KJ, Chang SE, Paik EM, Lee MW and Choi JH. Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the proliferation of HaCaT cell via TGF-alpha. *Neuropeptides* 1999; 33: 435-446
601. Suter U, Heymach JV Jr and Shooter EM. Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF. *EMBO J.* 1991; 10: 2395-2400
602. Svensson P, Cairns BE, Wang K and Arendt-Nielsen L. Injection of nerve growth factor into human masseter muscle evokes long-lasting mechanical allodynia and hyperalgesia. *Pain* 2003; 104: 241-247
603. Sydow O, Hansson P, Young D, Meyerson B, Backlund EO, Ebendal T, Farnebo L-O, Freedman R, Hamberger B, Hoffer B, Seiger Å, Strömberg I and Olson L. Long-term beneficial effects of adrenal medullary autografts supported by nerve growth factor in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 1995; 2: 445-454

604. Szeberényi J. Gene activation pathways of nerve growth factor signaling: a minireview. *Neurobiol.* 1996; 4: 1-11
605. Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J and Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 123: 936-942
606. Söderström S, Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H and Ebendal T. Recombinant human beta-nerve growth factor: biological activity and properties in an enzyme immunoassay. *J. Neurosci. Res.* 1990; 27: 665-677
607. Tabeka Y, Suzuki N, Takeno M, Asai T, Tsuboi S, Hoshino T and Sakane T. Modulation of synovial cell function by somatostatin in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 2128-2138
608. Taiwo YO and Levine JD. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res.* 1990; 537: 372-374
609. Taiwo YO and Levine JD. Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat. *Neurosci.* 1992; 48: 485-490
610. Takafuji S, Bischoff SC, De Weck AL and Dahinden CA. Opposing effects of tumor necrosis factor- α and nerve growth factor upon leukotriene C4 production by human eosinophils triggered with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Eur. J. Immunol.* 1992; 22: 969-974
611. Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, Motegi M, Okada Y and Kakiuchi T. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine. *Spine* 1996; 21: 218-224
612. Tal M and Liberman R. Local injection of nerve growth factor (NGF) triggers degranulation of mast cells in rat paw. *Neurosci. Lett.* 1997; 221: 129-132
613. Teresi S, Boudard F and Bastide M. Effect of calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide on murine CD4 and CD8 T cell proliferation. *Immunol. Lett.* 1996; 50: 105-113
614. Theodosiou M, Rush RA, Zhou XF, Hu D, Walker JS, Tracey DJ. Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. *Pain* 1999; 81: 245-255
615. Theoharides TC and Douglas WW. Mast cell histamine secretion in response to somatostatin analogues: structural considerations. *Eur. J. Pharmacol.* 1981; 73: 131-136
616. Thoenen H and Barde Y-A. Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 1980; 60: 1284-1335
617. Thoenen H, Bandtlow C and Heumann R. The physiolocal function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 1987; 109: 145-178
618. Thomas KA, Baglan NC and Bradshaw RA. The amino acid sequence of the γ -subunit of mouse submaxillary gland 7S nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1981a; 256: 9156-9166
619. Thomas KA, Silverman RE, Jeng I, Baglan NC and Bradshaw RA. Electrophoretic heterogeneity and polypeptide chain structure of the γ -subunit of mouse submaxillary 7S nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 1981b; 256: 9147-9155
620. Thompson M and Bywaters EGL. Unilateral rheumatoid arthritis following hemiplegia. *Ann. Rheum. Dis.* 1966; 21:370-377
621. Thompson SWN, Bennett DLH, Kerr BJ, Bradbury EJ and McMahon SB. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 7714-7718
622. Thorpe LW and Perez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* 1987; 18: 134-139
623. Thorpe LW, Stach RW, Hashim GA, Marchetti D and Perez-Polo JR. Receptors for nerve growth factor on rat spleen mononuclear cells. *J. Neurosci. Res.* 1987a; 17: 128-134
624. Thorpe LW, Werrbach-Perez K and Perez-Polo JR. Effects of nerve growth factor on the expression of interleukin-2 receptors on cultured human lymphocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1987b; 496: 310-311

625. Tomlinson DR, Fernyhough P and Diemel LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes* 1997; 46: S43-S49
626. Toms R, Weiner HL and Johnson D. Identification of IgE-positive cells and mast cells in frozen sections of multiple sclerosis brains. *J. Neuroimmunol.* 1990; 30: 169-177
627. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, Nencioni L, Labardi D, Rubartelli A, Cozzolino F, Aloe L and Garaci E. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B-lymphocytes. *Cell.* 1996; 85: 345-356
628. Toyoda M, Nakamura M, Makino T, Hino T, Kagoura M and Morohashi M. Nerve growth factor and substance P are useful plasma markers of disease activity in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 2002, 147: 71-79
629. Tranzer JP and Thoenen H. An electron microscopy study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. *Experientia* 1968; 24: 155-156
630. Treede RD, Meyer RA, Raja SN and Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog. Neurobiol* 1992; 38: 397-421
631. Tria MA, Fusco M, Vantini G and Mariot R. Pharmacokinetics of nerve growth factor (NGF) following different routes of administration to adult rats. *Exp. Neurol.* 1994; 127: 178-183
632. Tsen LC, Natale M, Datta S and Eappen S. Can estrogen influence the response to noxious stimuli? *J. Clin. Anesth.* 2001; 13: 118-121
633. Tsuda T, Wong D, Dolovich J, Bienenstock J, Marshall J and Denburg JA. Synergistic effects of nerve growth factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on human basophilic cell differentiation. *Blood* 1991; 77: 971-979
634. Turrini P, Gaetano C, Antonelli A, Capogrossi MC and Aloe L. Nerve growth factor induces angiogenic activity in a mouse model of hindlimb ischemia. *Neurosci. Lett.* 2002; 323: 109-112
635. Tuszyński MH, U HS, Amaral DG and Gage F. Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 1990; 10: 3604-3614
636. Tuttle JB, Etheridge R and Creedon DJ. Receptor-mediated stimulation and inhibition of nerve growth factor secretion by vascular smooth muscle. *Exp. Cell. Res.* 1993; 208: 350-361
637. Tuveri MA, Passiu G, Mathieu A and Aloe L. Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1993; 11: 319-322
638. Tuveri MA, Generini S, Matucci-Cerinic M and Aloe L. NGF, a useful tool in the treatment of chronic vasculitic ulcers in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2000; 356: 1739-1740
639. Uddman R, Edvinsson L, Ekblad E, Håkanson R and Sundler F. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): perivascular distribution and vasodilatory effects. *Regul. Pept.* 1986a; 15: 1-23
640. Uddman R, Edvinsson L, Jansen I, Stiernholm P, Jensen K, Olesen J and Sundler F. Peptide-containing nerve fibers in human extracranial tissue: a morphological basis for neuropeptide involvement in extracranial pain? *Pain* 1986b; 27: 391-399
641. Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y and Eguchi K. Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 1996; 23: 230-236
642. Ullrich A, Gray A, Berman C and Dull TJ. Human β -nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature* 1983; 303: 821-825
643. Ullrich A, Gray A, Wood WI, Hayflick J and Seeburg P. Isolation of a cDNA clone coding for the gamma-subunit of mouse nerve growth factor using a high-stringency selection procedure. *DNA* 1984; 3: 387-392
644. Unsicker K, Krisch B, Otten U and Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978; 75: 3498-3502

645. van de Loo FA, Joosten LA, van Lent PL, Arntz OJ and van den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 164-172
646. Van der Zee CE, Fawcett J and Diamond J. Antibody to NGF inhibits collateral sprouting of septohippocampal fibers following entorhinal cortex lesion in adult rats. *J. Comp. Neurol.* 1992; 326: 91-100
647. Van der Zee CE, Lourenssen S, Stanisiz J and Diamond J. NGF deprivation of adult rat brain results in cholinergic hypofunction and selective impairments in spatial learning. *Eur. J. Neurosci.* 1995; 7: 160-168
648. Vantini G, Schiavo N, Di Martino A, Polato P, Triban C, Callegaro L, Toffano G and Leon A. Evidence for a physiological role of nerve growth factor in the central nervous system of neonatal rats. *Neuron* 1989; 3: 267-273
649. Varon S and Shooter EM. The nerve growth factor proteins of the mouse submaxillary gland. In: Bowman, R.E., Datta, S.P. (eds) *Biochemistry of brain and behaviour*. Plenum, New York, pp 41-64
650. Varon S, Nomura J and Shooter EM. Reversible dissociation of the mouse nerve growth factor protein into different subunits. *Biochem.* 1968; 7: 1296-1303
651. Veenstra TD, Fahnestock M and Kumar R. An AP-1 site in the nerve growth factor promoter is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated nerve growth factor expression in osteoblasts. *Biochem.* 1998, 37: 5988-5994
652. Ventriglia M, Bocchio Chiavetto L, Benussi L, Binetti G, Zanetti O, Riva MA and Gennarelli M. Association between the BDNF 196 A/G polymorphism and sporadic Alzheimer's disease. *Mol. Psych.* 2002; 7: 136-137
653. Verdi JM, Birren SJ, Ibáñez CF, Persson H, Kaplan DR, Benedetti M, Chao MV and Anderson DJ. p75^NNGFR regulates trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron* 1994; 12: 733-745
654. Verge VMK, Richardson PM, Benoit R and Riopelle RJ. Histochemical characterization of sensory neurons with high-affinity receptors for nerve growth factor. *J. Neurocytol.* 1989; 18: 583-591
655. Verge VMK, Merlio J-P, Grondin J, Ernfors P, Persson H, Riopelle RJ, Hökfelt T and Richardson PM. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J. Neurosci.* 1992; 12: 4011-4022
656. Verge VMK, Richardson PM, Wiesenfeld-Hallin Z and Hökfelt T. Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *J. Neurosci.* 1995; 15: 2081-2096
657. Via CS, Tsokos GC, Bermas B, Clerici M and Shearer GM. T cell-antigen-presenting cell interactions in human systemic lupus erythematosus. Evidence for heterogeneous expression of multiple defects. *J. Immunol.* 1993; 151: 3914-3922
658. Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P and Fuks Z. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem.* 1991; 16: 268-271
659. Walicke PA. Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions. *J. Neurosci.* 1988; 8: 2618-2617
660. Wallach D, Arumugam TU, Boldin MP, Cantarella G, Ganesh KA, Goltsev Y, Goncharov TM, Kovalenko AV, Rajput A, Varfolomeev EE and Zhang SQ. How are the regulators regulated? The search for mechanisms that impose specificity on induction of cell death and NF- κ B activation by members of the TNF/NGF receptor family. *Arthritis Res.* 2002; 4: S189-S196
661. Wallengren J and Håkanson R. Effects of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in human skin and their involvement in sensory nerve-mediated responses. *Eur. J. Pharmacol.* 1987; 143: 267-273
662. Wallengren J, Ekman R and Sundler F. Occurrence and distribution of neuropeptides in human skin. An immunocytochemical and immunohistochemical study on normal skin and blister fluid from inflamed skin. *Acta. Dermatol. Venereol. (Stockh)* 1987; 67: 185-192

663. Wang F, Millet I, Bottomly K and Vignery A. Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J. Biol. Chem* 1992; 267: 21052-21057
664. Warren JB, Larkin SW, Coughlan M, Kajekar R and Williams TJ. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is a potent vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1992; 106: 331-334
665. Warren JB, Wilson AJ, Loi RK and Coughlan ML. Opposing roles of cyclic AMP in the vascular control of edema formation. *FASEB J.* 1993; 7: 1394-1400
666. Weskamp G and Otten U. An enzyme-linked immunoassay for nerve growth factor (NGF): a tool for studying regulatory mechanisms involved in NGF production in brain and in peripheral tissues. *J. Neurochem.* 1987; 48: 1779-1786
667. White B. Immune abnormalities in systemic sclerosis. *Clin. Dermatol.* 1994; 12: 349-359
668. Whittemore SR and Seiger A. The expression, localization and functional significance of beta-nerve growth factor in the central nervous system. *Brain. Res.* 1987; 434: 439-464
669. Whittemore SR, Friedman PL, Larhammar D, Persson H, Gonzalez-Carvajal M and Holets VR. Rat beta-nerve growth factor sequence and site of synthesis in the adult hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 1988; 20: 403-410
670. Wiesenfeld-Hallin Z, Hökfelt, T, Lundberg JM, Forssman WG, Reinecke M, Tschopp FA and Fisher JA. Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci. Lett.* 1984; 52: 199-204
671. Wilkinson DI. Mitogenic effect of substance P and CGRP on keratinocytes. *J. Cell. Biol.* 1989; 107: 509A
672. Wilkinson DI, Theeuwes MJ and Farber EM. Nerve growth factor increases the mitogenicity of certain growth factors for cultured human keratinocytes: a comparison with epidermal growth factor. *Exp. Dermatol.* 1994; 3: 239-245
673. Williams LR, Varon S, Peterson GM, Victorin K, Fischer W, Björklund A and Gage FH. Continuous infusion of nerve growth factor prevents basal forebrain neuronal death after fimbria-fornix transection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 9231-9235
674. Williams TJ. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E2 as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br. J. Pharmacol.* 1982; 77: 505-509
675. Willis WD Jr. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp. Brain. Res.* 1999; 124: 395-421
676. Wion D, Perret C, Fréchin N, Keller A, Béhar G, Brachet P and Auffray C. Molecular cloning of the avian β -nerve growth factor gene: transcription in brain. *FEBS. Lett.* 1986; 203: 82-86
677. Wollina U, Huschenbeck J, Knöll B, Sternberg B and Hipler UC. Vasoactive intestinal peptide supports induced migration of human keratinocytes and their colonization of an artificial polyurethane matrix. *Regul. Pept.* 1997; 70: 29-36
678. Wong J and Oblinger MM. NGF rescues substance P expression but not neurofilament or tubulin gene expression in axotomized sensory neurons. *J. Neurosci.* 1991; 11: 543-552
679. Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 1983; 306: 686-688
680. Woolf CJ and Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A β -fiber inputs. *Curr Opin. Neurobiol.* 1994; 4: 525-534
681. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP, Crilly P and Winter J. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity. *Neuroscience* 1994; 62: 327-331
682. Woolf CJ, Ma Q-P, Allchorne A and Poole S. Peripheral cell types contributing to the hyperalgesic action of nerve growth factor in inflammation. *J. Neurosci.* 1996; 16: 2716-2723
683. Wyatt S, Shooeter EM and Davies AM. Expression of the NGF receptor gene in sensory neurons and their cutaneous targets prior to and during innervation. *Neuron* 1990; 4: 421-427

684. Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann MJ and Patterson PH. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 1989; 246: 1412-1416
685. Yamamoto M, Ito Y, Mitsuma N, Li M, Hattori N and Sobue G. Pathology-related differential expression regulation of NGF, GDNF, CNTF, and IL-6 mRNAs in human vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 2001; 24: 830-833
686. Yardley G, Relf B, Lakshmanan J, Reinshagen M and Moore GP. Expression of nerve growth factor mRNA and its translation products in the anagen hair follicle. *Exp. Dermatol.* 2000; 9: 283-289
687. Yiangou Y, Facer P, Sinicropi DV, Boucher TJ, Bennett DL, McMahon SB and Anand P. Molecular forms of NGF in human and rat neuropathic tissues: decreased NGF precursor-like immunoreactivity in human diabetic skin. *JPNS.* 2002; 7: 190-197
688. Yoshida K and Gage FH. Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain. Res.* 1991; 538: 118-126
689. Yoshizawa H, O'Brien JP, Smith WT and Trumper M. The neuropathology of intervertebral discs removed for low-back pain. *J. Pathol.* 1980; 132: 95-104
690. Zabel BU, Eddy RL, Lalley PA, Scott J, Bell GI and Shows TB. Chromosomal locations of the human and mouse genes for precursors of epidermal growth factor and the β subunit of nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82: 469-473
691. Zhang Y, Danielsen N, Sundler F and Mulder H. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is upregulated in sensory neurons by inflammation. *Neuroreport* 1998; 9: 2833-2836
692. Zhou XF and Rush RA. Endogenous brain-derived neurotrophic factor is anterogradely transported in primary sensory neurons. *Neurosci.* 1996; 74: 945-953
693. Zhu Z, Friess H, diMola FF, Zimmermann A, Graber HU, Korc M and Büchler MW. Nerve growth factor expression correlates with perineural invasion and pain in human pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 2419-2428
694. Zupan AA, Osborne PA, Smith CE, Siegel NR, Leimgruber RM and Johnson EMJr. Identification, purification and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 11714-11720
695. Zvaifler NJ. A retrospective analysis of the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rev. Rhum.* 1996; 63: 791-796