

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Direktor: Prof. Dr. Harald Renz

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

Die Verstärkung der Frühphasereaktion des allergischen Asthma bronchiale durch den Nervenwachstumsfaktor NGF

Experimente an einem Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nina Meents

aus Köln

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 26.01.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. H. Renz

Korreferent: Prof. Dr. H. Fehrenbach

Inhaltsverzeichnis.....	3
I. Zusammenfassung	6
II. Einleitung.....	8
II.1 Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale.....	8
II.1.1 Entzündung der Atemwege	8
II.1.2 Atemwegsobstruktion.....	9
II.1.3 Atemwegshyperreagibilität.....	10
II.1.4 Neurogene Entzündung.....	10
II.2 NGF (<i>Nerve Growth Factor</i>)	13
II.2.1 NGF und allergische Frühphasereaktion	15
II.3 Fragestellung.....	17
III. Material und Methoden.....	18
III.1 Tiere.....	18
III.1.1 Genotypisierung.....	19
III.2 Versuchsprotokoll	20
III.2.1 Sensibilisierung.....	24
III.2.2 Allergen-Provokation 1 und 2 (Induktion der allergischen Entzündung)	25
III.2.3 Intranasale Behandlung der BALB/c-Mäuse mit anti-NGF	25
III.2.4 Allergen-Provokation 3 (Messung von Atemwegsreaktivität und sensorischer Atemwegsreagibilität)	26
III.3 <i>Head-out</i> Bodyplethysmographie	27
III.3.1 Bestimmung von allergischer Frühphasereaktion und Atemwegsreaktivität	29
III.3.2 Bestimmung der sensorischen Reagibilität	30
III.4 Serumgewinnung.....	31
III.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)	31
III.5.1 Zytospin	32

III.6 Messung der Zytokine und Immunglobuline mittels ELISA	33
III.6.1 Bestimmung der Zytokine aus BALF	33
III.6.2 Messung der Immunglobuline aus dem Serum	35
III.7 Statistische Analyse	36
IV. Ergebnisse	37
IV.1 Allergische Frühphasereaktion.....	37
IV.1.1 Abschwächung der allergischen Frühphasereaktion durch Anti-NGF.....	37
IV.1.2 Verstärkung der allergischen Frühphasereaktion durch lokale NGF- Überproduktion in der Lunge	39
IV.2 Verstärkung der Atemwegsentzündung durch NGF, Abschwächung durch Anti-NGF	40
IV.3 Keine Unterschiede in IgE-Serumspiegeln	44
IV.4 Verstärkte Serotoninfreisetzung in CCSP-NGF-tg-Mäusen	46
IV.5 Keine Beeinflussung der Atemwegsreaktivität durch Anti-NGF	47
IV.6 Erhöhte Sensorische Reagibilität der Atemwege in CCSP-NGF-tg-Mäusen	48
V. Diskussion	50
V.1 Schlussfolgerung	57
VI. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
VII. Abkürzungsverzeichnis	61
VIII. Literaturverzeichnis	64
IX. Publikation	78

X. Lehrerverzeichnis.....	79
XI. Danksagung.....	80

I ZUSAMMENFASSUNG

Das allergische Asthma bronchiale ist gekennzeichnet durch mehrere wesentliche pathogene Komponenten: die allergische Atemwegsentzündung, die Atemwegsobstruktion mit allergischer Früh- und Spätphasereaktion sowie die Atemwegshyperreagibilität und neurogene Entzündung.

Der allergischen Sensibilisierung folgt die Allergen-induzierte Kreuzvernetzung der IgE-Moleküle auf Mastzellen, woraufhin diese zur Degranulation angeregt werden. Die ausgeschütteten Mediatoren wie Serotonin (Maus) und Histamin (Mensch) wirken proinflammatorisch und bewirken die Kontraktion glatter Muskelzellen in den Atemwegen. Die chronische Atemwegsentzündung verstärkt wiederum die Freisetzung von Tachykininen wie Substanz P (SP), was zu Hyperreagibilität der Atemwege führt.

Allergisches Asthma ist außerdem assoziiert mit erhöhten pulmonalen Spiegeln des Nervenwachstumsfaktors NGF (engl.: *Nerve Growth Factor*). Während bereits gezeigt werden konnte, dass NGF zu der akuten Atemwegsentzündung des allergischen Asthma bronchiale beiträgt, ist ein möglicher Einfluss von NGF auf die allergische Frühphasereaktion bisher unklar.

Diese Studie untersucht die Rolle des NGF in der allergischen Frühphasereaktion an einem etablierten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung. Die zentrale Hypothese der Arbeit ist, dass NGF die allergische Frühphasereaktion zu verstärken vermag. Erste Untersuchungen zeigten, dass durch Blockierung von NGF sowohl die allergische Frühphasereaktion verhindert als auch die Atemwegsentzündung unterdrückt werden konnte. Hierbei wurden mit Ovalbumin (OVA) sensibilisierte und per Aerosol provozierte BALB/c-Mäuse mit einem blockierenden anti-NGF-Antikörper behandelt. Daraufhin wurde in einem Bodyplethysmographen die Reaktion auf die nasale Applikation des Allergens gemessen. Um zu untersuchen, ob dementsprechend ein Überangebot an NGF in den Atemwegen die Frühphasereaktion zu verstärken vermag, wurden transgene Mäuse mit lokal konstitutiver NGF-Überproduktion in den Atemwegen (*clara cell secretory protein promotor (CCSP-) NGF-tg*) eingesetzt und mit wildtyp-Mäusen (*NGF-wt*) verglichen. Es zeigte sich, dass bei sensibilisierten und

provozierten CCSP-NGF-*tg*-Mäusen, im Gegensatz zu den NGF-*wt*-Mäusen, die allergische Frühphasereaktion signifikant verstärkt war. Die zentrale Hypothese der Arbeit konnte damit bestätigt werden. Um darüber hinaus den Weg zu analysieren, über welchen NGF seine Effekte vermittelt, wurden zunächst die Auswirkungen von NGF auf die allergische Atemwegsentzündung untersucht. Per Bronchoalveolärer Lavage (BAL) konnte eine Differenzierung entzündlicher Zellen aus den Atemwegen sowie eine Messung der Zytokinspiegel durchgeführt werden. Hier zeigte die Behandlung mit anti-NGF eine Abschwächung der Atemwegsentzündung, wohingegen die CCSP-NGF-*tg*-Mäuse, verglichen mit den NGF-*wt*, eine verstärkte Atemwegsentzündung aufwiesen. Es ist also möglich, dass NGF seinen Effekt auf die Frühphasereaktion über die Verstärkung der Atemwegsinfektion bewirkt. Eine weitere Möglichkeit, nach der NGF über eine Modifizierung der IgE-Spiegel seine Effekte vermittelt, konnte ausgeschlossen werden. Weder die Blockierung noch die Überproduktion von NGF hatten eine Auswirkung auf die IgE-Spiegel. Währenddessen zeigten Untersuchungen zu einer möglichen Wirkung von NGF über eine verstärkte Degranulation von Serotonin aus Mastzellen, dass in CCSP-NGF-*tg* im Gegensatz zu NGF-*wt*-Mäusen die Serotoninspiegel in den Atemwegen tatsächlich signifikant erhöht waren.

Die Auswirkung einer Behandlung von anti-NGF bzw. NGF auf die Reaktivität glatter Muskelzellen in den Atemwegen, über welche NGF die Frühphasereaktion möglicherweise auszulösen vermag, wurde mittels einer Provokation mit Methacholin (Mch), einem Marker der Empfindlichkeit glatter Muskelzellen, gemessen. Hier jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen einer Behandlung mit anti-NGF oder, reziprok, mit NGF. Eine NGF-vermittelte Wirkung auf die sensorische Hyperreagibilität in den Atemwegen konnte jedoch demonstriert werden. So entwickelten CCSP-NGF-*tg*-Mäuse eine erhöhte sensorische Atemwegsreagibilität auf die Inhalation des Nervenstimulanz Capsaicin.

Diese Daten zeigen deutlich eine funktionelle Rolle von NGF in der Entwicklung der allergischen Frühphasereaktion in den Atemwegen.

II EINLEITUNG

Das allergische Asthma bronchiale ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen, an der inzwischen 5 - 10% der Bevölkerung leiden, und deren Prävalenz trotz des medizinischen Fortschrittes in westlichen Industrieländern weiter ansteigt (Botchkarev et al., 1998, Herz et al., 1998, Leung et al., 1997, Ninan et al., 1992, Shaw et al., 1990). Die Charakteristika des allergischen Asthma bronchiale sind eine chronische Entzündung der Atemwege mit reversiblen Atemwegsobstruktionen, erhöhte IgE-Serumspiegel, eine schwer beherrschbare Atemwegshyperreagibilität (Bousquet et al., 2000, Busse & Lemanske, 2001, Holt et al., 1999) und neuronale Dysfunktionen in der erkrankten Lunge (Lundberg, 1995).

II.1 Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale

II.1.1 Entzündung der Atemwege

Die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale nimmt ihren Ausgangspunkt in der immunologischen Sensibilisierung des Patienten gegen ein an sich harmloses Umweltallergen. Initial gelangt ein Antigen über die epithelialen Barrieren in den Körper und wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie z.B. Lungenmakrophagen, aufgenommen, intrazellulär prozessiert und als Peptidfragment von MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieser Peptid-MHC-II-Komplex wird von CD4-positiven T-Helferzellen (Th-Zelle) über einen entsprechenden T-Zellrezeptor erkannt. Beim Kontakt mit B-Zellen, die antigenspezifische Immunglobuline auf ihrer Oberfläche exprimieren, kommt es zur Induktion der Proliferation und Ausdifferenzierung der B-Zelle zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Das Zytokinprofil der Zelle entscheidet hierbei, welche Ig-Klasse von der B-Zelle produziert wird. Th2-Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-13 begünstigen einen Klassenwechsel zu IgE und IgG₄ (Maus: homolog IgG₁), während Th1-Zytokine wie IFN- γ und IL-2 die Bildung anderer IgG-Klassen induzieren. Es ist jedoch nur sehr wenig darüber bekannt, welche Signale ursächlich eine Th1- und

welche eine Th2-Immunantwort initiieren. Die allergische Sensibilisierung ist aber durch einen Th2-Phänotyp charakterisiert.

Kommt es nach der initialen Sensibilisierung des Immunsystems zu einem weiteren Allergenkontakt über die Atemwegsmukosa, werden die Allergenspezifischen T- und B-Zellen erneut aktiviert. Die resultierende lokale Freisetzung von Th2-Zytokinen sowie die Erhöhung der IgE-Produktion initiiert die Atemwegsentzündung. Durch die Bindung des Allergens an Allergenspezifisches IgE, welches an FcεRII-Rezeptoren (CD23) auf der Oberfläche von Lungenmastzellen gebunden ist, kommt es zur Kreuzvernetzung der Rezeptoren und in Folge zur Degranulation der Mastzellen (Turner & Kinet, 1999). Die ausgeschütteten proinflammatorischen Mediatoren wie Histamin, Eicosanoide, Leukotriene und Sauerstoffradikale verstärken die Entzündungsreaktion zusätzlich. Folge des wiederholten Allergenkontaktes ist eine Chronifizierung der Atemwegsentzündung. Neben den bekannten Symptomen des Asthma bronchiale kommt es zum Umbau des Lungengewebes. Es findet sich eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen, eine Verdickung der Basalmembran sowie eine Metaplasie der Epithelzellen mit Umwandlung in Mukus-produzierende Becherzellen (Blyth et al., 1998, Hogan et al., 1997, Kay, 1996, Lambrecht et al., 1998).

II.1.2 Atemwegsobstruktion

Die Inhalation von Allergenen löst beim allergischen Asthma die akute Bronchoobstruktion aus, welche als allergische Frühphasereaktion bezeichnet wird. Diese Frühphasereaktion tritt innerhalb von Minuten ein und ist kurzfristig (Cieslewicz et al., 1999, Cockcroft et al., 1977). Die Allergen-induzierte Kreuzvernetzung der an FcεRII gebundenen IgE-Moleküle auf der Mastzelle führt zur Degranulation. Die ausgeschütteten Mediatoren, vor allem Histamin beim Menschen und Serotonin bei der Maus, wirken nicht nur proinflammatorisch sondern sind auch für die allergische Frühphasereaktion verantwortlich (Bradding et al., 1994, Jarjour et al., 1997, Liu et al., 1991, Murray et al., 1985, Wenzel et al., 1989). Einmal sezerniert induzieren diese Substanzen in Minuten die Konstriktion der Atemwege und steigern die Mukussekretion und Vasodilatation. Dadurch kommt es zu einem vorübergehend erhöhten expiratorischen Atemwiderstand, den der Patient als

bedrohliche Luftknappheit empfindet. Der akuten allergischen Frühphasereaktion kann eine um Stunden verzögerte Spätphasereaktion folgen (Durham, 1991), welche durch die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, insbesondere T-Zellen und Eosinophile, initiiert wird (Bousquet et al., 2000). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Blockierung des von diesen Zellen sezernierten Th-2-Zytokins IL-5 mit spezifischen Antikörpern einen weiteren chemotaktisch induzierten Influx von Eosinophilen unterbindet und die Spätphasereaktion ausbleibt (Cieslewicz et al., 1999). Die Gabe von blockierenden Antikörpern gegen IL-5 hat jedoch keinen Einfluss auf die allergische Frühphasereaktion.

II.1.3 Atemwegshyperreagibilität

Die Atemwegshyperreagibilität (AHR) ist als Überempfindlichkeit der Atemwege auf unspezifische Reize definiert, d.h. die für die Induktion einer Atemwegskonstriktion notwendige Provokationsdosis konstriktorisch wirkender Stimuli ist geringer als bei Nichtasthmatikern. Bei bestehender AHR können die Inhalation von neuronalen Rezeptoragonisten (z.B. Acetylcholin, Methacholin, Carbachol) und Mediatoren der allergischen Entzündung (z.B. Histamin, Leukotriene, PAF, Prostaglandine) oder physikalische Stimuli wie Anstrengung, kalte oder trockene Luft sowie hypo- und hypertensive Lösungen eine Atemwegskonstriktion auslösen. Die für die Entstehung der AHR verantwortlichen Vorgänge sind weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass die neuronale Irritation zu einer Reizung sensibler C-Fasern, zu parasympathischen Reflexen und vor allem zu lokaler Freisetzung von Neuropeptiden wie z.B. Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) aus sensorischen Nervenendigungen führt. Mittels Axonreflex kann sich diese sensorische Reaktion auch auf umliegende Bereiche ausdehnen (Barnes, 1995).

II.1.4 Neurogene Entzündung

In den Lungen bzw. bronchoalveolären Lavagen von Asthmapatienten und Mäusen mit experimentell induzierter Atemwegsentszündung wurden erhöhte Spiegel von SP nachgewiesen (Baumgarten et al., 1996, Kaltreider et al.,

1997). Das lässt schließen, dass die allergische Entzündungssituation die Freisetzung von SP verstärkt. Tachykinine wie SP werden von sensorischen Neuronen nach Reizung freigesetzt. SP kann Mastzellen zur Degranulation anregen und somit die Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur hervorrufen (Barnes, 1996, Cheung et al., 1994, Germonpre et al., 1998). SP ist darüber hinaus in der Lage, die Mukusproduktion zu erhöhen und die vorhandene Atemwegsentzündung durch die weitere Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten sowie Mastzellen und die chemotaktische Wirkung auf eosinophile und neutrophile Granulozyten zu verstärken. Zusätzlich induziert SP die Proliferation von glatter Muskulatur (*in vitro*) sowie die Dilatation und Permeabilisierung der Blutgefäße (Barnes, 1996, Joos et al., 2000). Die Blockierung von Neurokininrezeptoren mit dem Antagonisten FK224 verringert sowohl die AHR (De Vries et al., 1999) als auch die Atemwegsentzündung (Quarcoo et al., 2004). Substanz P zählt also zu den wesentlichen Komponenten der neurogenen Entzündung.

Die Abbildung 1 zeigt den Zusammenhang zwischen verschiedenen Komponenten in der Pathogenese der Asthmaerkrankung:

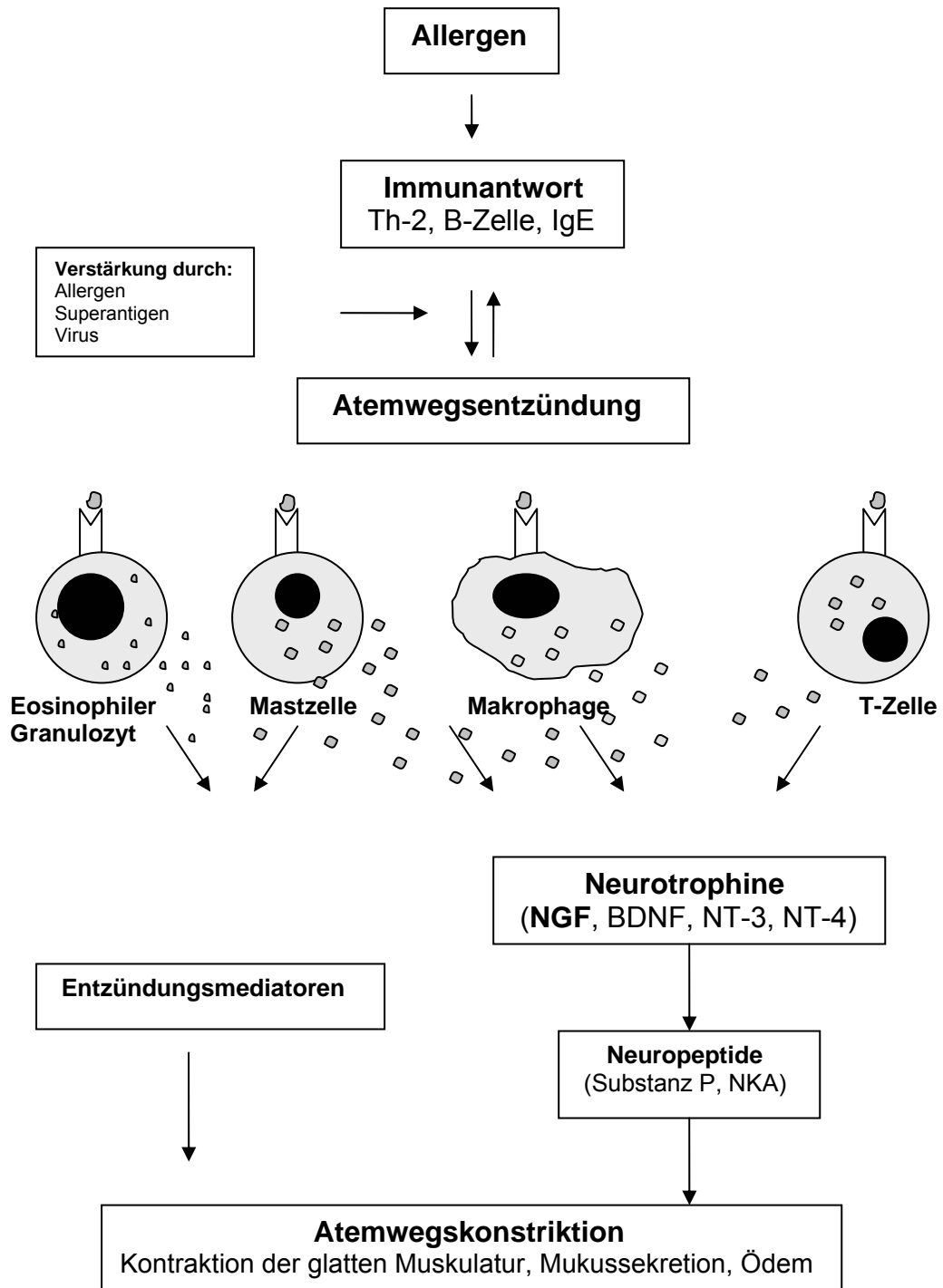


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen verschiedenen Komponenten in der Pathogenese des Asthma bronchiale
 (Nach Dr. A. Braun, Dissertationsschrift, 1999)

II.2 NGF (*Nerve Growth Factor*)

NGF gehört zusammen mit BDNF (engl.: *brain derived neurotrophic factor*) sowie Neurotrophin (NT)-3 und -4 zur Familie der Neurotrophine. Ihre ursprünglich beschriebene wesentliche Funktion besteht in der Regulation des Überlebens und der Differenzierung von Neuronen sowie der Neuropeptidsynthese (Lewin & Barde, 1996). Die zellulären Neurotrophinsignale werden über zwei distinkte Rezeptortypen vermittelt, die hochaffinen Tyrosinkinase-rezeptoren trkA, trkB und trkC ($K_d \sim 10^{-11}$) sowie dem niedrigaffinen Neurotrophinrezeptor p75^{NTR} ($K_d \sim 10^{-9}$). Der trkA-Rezeptor hat die höchste Bindungsaffinität zu NGF, trkB die höchste zu BDNF und NT-4, trkC ist hochaffin für NT-3 (Barbacid, 1994). Der niedrigaffine p75^{NTR}-Rezeptor bindet unspezifisch alle Neurotrophine.

Neurotrophine wurden ursprünglich als Sekretionsprodukte von Nerven-assoziierten Zellen und Neuronen beschrieben (Levi-Montalcini et al., 1995, Lewin & Barde, 1996). Heute ist aber bekannt, dass NGF darüber hinaus auch von Mastzellen (Leon et al., 1994), Makrophagen (Braun et al., 1998), T-Zellen (Ehrhard et al., 1993) und B-Zellen (Torcia et al., 1996), Eosinophilen (Noga et al., 2003) sowie von Lungenfibroblasten und Epithelzellen produziert wird (Fox et al., 2001, Kassel et al., 2001, Olgart & Frossard, 2001). Neurotrophine, insbesondere NGF, gelten mittlerweile als Mediatoren der Interaktion von Immun- und Nervenzellen (Levi-Montalcini et al., 1996). Auch die Neurotrophinrezeptoren werden nicht nur von Zellen des peripheren und des zentralen Nervensystems exprimiert, sondern auch von Zellen des Immunsystems. Beispielsweise findet sich der hochaffine NGF-Rezeptor trkA auf Mastzellen (Horigome et al., 1993, Nilsson et al., 1997), Makrophagen (Ehrhard et al., 1994, Garcia-Suarez et al., 1997, Garcia-Suarez et al., 1998, Shibayama & Koizumi, 1996, Susaki et al., 1996), T- und B-Zellen (Ehrhard et al., 1993, Garcia-Suarez et al., 1997, Garcia-Suarez et al., 1998, Maroder et al., 1996, Melamed et al., 1996, Torcia et al., 1996) und auf Eosinophilen (Nassenstein et al., 2003). Folglich werden die beschriebenen Zellen durch NGF beeinflusst (Abb.2).

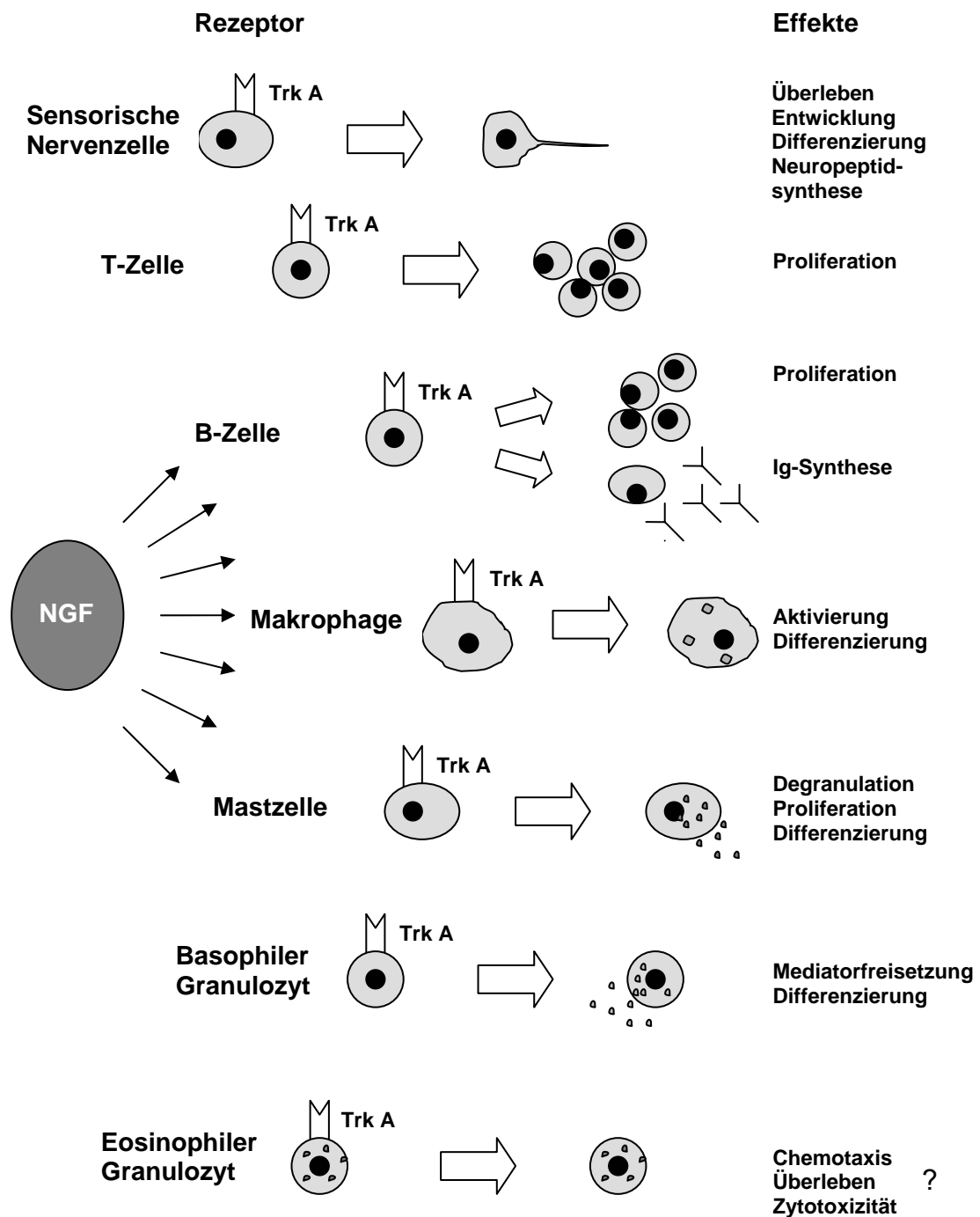


Abbildung 2: Wirkung des NGF auf verschiedene Zellen des Immunsystems
 (Nach Dr. A. Braun, Dissertationsschrift, 1999)

Im Zusammenspiel zwischen Immun- und Nervensystem besitzt NGF eine Schlüsselrolle für die zuvor beschriebene neurogene Entzündung. Die lokale Atemwegsentzündung verursacht eine verstärkte Freisetzung von NGF aus Immunzellen (Bonini et al., 1996, Braun et al., 1998, Sanico et al., 2000, Virchow et al., 1998), welches die neuronale Produktion von SP stimuliert

(Donnerer et al., 1992, Hunter et al., 2000, Lindsay & Harmar, 1989, Vedder et al., 1993). SP heizt wiederum durch seine vielfältigen proinflammatorischen Wirkungen (Joos et al., 2000) die Atemwegs- und in Folge die neurogene Entzündungssituation weiter an. Die Neurone reagieren dadurch immer empfindlicher auf eine Vielzahl unspezifischer Stimuli, was daran liegen mag, dass es durch die verringerte Reizschwelle zu einer verstärkten Freisetzung von Tachykininen kommt (Hoyle et al., 1998, MacLean et al., 1988). So gibt es Hinweise dafür, dass in entzündeten Atemwegen beim Menschen die Anzahl der Tachykininrezeptoren sowie die Menge der freigesetzten Tachykinine erhöht ist (Reynolds et al., 1997). NGF ist also sowohl für die Entstehung der AHR als auch der neurogenen Entzündung in den Atemwegen von Bedeutung.

II.2.1 NGF und allergische Frühphasereaktion

Allergien sind assoziiert mit erhöhter NGF-Produktion. Lambiase *et al.* (Lambiase et al., 1995) beschrieben als erste beträchtlich erhöhte systemische NGF-Spiegel in Patienten mit frühjähriger allergischer Kerato- und Rhinokonjunktivitis. Eine spätere Studie zeigte, dass die systemischen NGF-Spiegel mit der Schwere der Allergie korrelieren, wobei die höchsten Werte bei Asthmatikern gefunden wurden (Bonini et al., 1996). Auch lokal ist NGF nach Allergenprovokation in nasalen und bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von Rhinitikern bzw. Asthmatikern (Bonini et al., 1996, Sanico et al., 2000, Virchow et al., 1998) sowie in Lungen von Mäusen mit experimentell induzierter allergischer Atemwegsentzündung signifikant erhöht (Braun et al., 1998). In diesem murinen Modell erwies sich NGF als ein Verstärkungsfaktor der Th2-Immunantwort und der AHR (Braun et al., 1998, Braun & Renz, 2001). Weiterhin erhöhen sowohl eine Vorbehandlung mit NGF, als auch eine lungenspezifische konstitutive NGF-Überexpression in Tiermodellen die experimentell induzierte AHR (Friberg et al., 2001, Hoyle et al., 1998). In diesem Zusammenhang zeigten Mäuse, denen das Gen für den niedrigaffinen p75^{NTR}-Rezeptor fehlte, eine starke Abschwächung der allergischen Atemwegsentzündung und AHR (Tokuoka et al., 2001).

Die allergische Frühphasereaktion basiert vor allem auf der Mediatorfreisetzung durch Mastzellen, was zur Konstriktion der glatten Muskulatur führt. Sie kann im Gegensatz zur Spätphasereaktion nicht durch eine experimentelle Behandlung mit anti-IL-5-Antikörpern verhindert werden. Wohl jedoch kann die Frühphasereaktion durch eine Behandlung mit anti-NGF-Antikörpern vermindert werden, was Untersuchungen an Meerschweinchen zeigen konnten (De Vries et al., 2002). Es ist bekannt, dass sich sowohl bei der Maus als auch beim Menschen NGF-spezifische trkA-Rezeptoren auf Mastzellen befinden, über die die Mediatorfreisetzung der Mastzellen angeregt bzw. verstärkt werden kann. Weitere Indizien weisen darauf hin, dass NGF auch chemotaktisch auf Mastzellen wirkt, und so eine Degranulation dieser bewirken kann (Bruni et al., 1982, Horigome et al., 1993, Marshall et al., 1990, Pearce & Thompson, 1986). NGF besitzt also eine direkte Wirkung auf die Aktivität der Mastzellen. Ebenfalls haben Tachykinine wie SP eine Wirkung auf Mastzellen, sie können diese zur Degranulation anregen und auf diesem Weg die Frühphasereaktion beeinflussen. Von SP weiß man, dass seine neuronale Produktion der direkten Kontrolle des NGF unterliegt. Es wird deutlich, dass NGF in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale eine entscheidende Rolle spielt. Ein direkter Effekt auf die allergische Frühphasereaktion bleibt zu untersuchen.

II.3 Fragestellung

Obwohl eine wachsende Zahl von Studien die Beteiligung von NGF in der Pathogenese der Atemwegsentzündung und der AHR untersucht, wurde eine direkte Wirkung von NGF auf die Allergen-induzierte asthmatische Bronchokonstriktion, kurz die Frühphasereaktion, bisher nicht beschrieben. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, die Rolle von NGF in der allergischen Frühphasereaktion in einem etablierten Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung zu untersuchen und den Weg, über den ein möglicher Effekt durch die Wirkung von NGF vermittelt wird, näher zu beleuchten. Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist:

NGF verstärkt die allergische Frühphasereaktion

Diese Hypothese soll mittels folgender Fragestellungen untersucht werden:

1. a) Zeigt die Blockierung von NGF eine Abschwächung der allergischen Frühphasereaktion?
b) Zeigt die pulmonale Überproduktion von NGF eine Verstärkung der allergischen Frühphasereaktion?
2. Wird dieser Effekt vermittelt über die Wirkung von NGF auf die:
 - a) Verstärkung der lokalen Inflammation in der Lunge?
 - b) IgE-Spiegel im Serum?
 - c) Degranulation von Lungenmastzellen?
 - d) Hyperreaktivität der glatten Muskulatur in den Atemwegen (Methacholin)?
 - e) Hyperreagibilität der sensorischen Neurone in den Atemwegen (Capsaicin)?

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Tiere

Das gut charakterisierte Immunsystem der Maus ist dem des Menschen in einigen wichtigen funktionellen Interaktionen sehr ähnlich. Dies betrifft im Wesentlichen immunologische Mechanismen der allergischen Reaktion, die sich bei Maus und Mensch nur geringfügig, z.B. in der Struktur einzelner Mediatoren und Immunglobulin-Subklassen, unterscheiden (Herz et al., 1996). Das hier verwendete etablierte und charakterisierte Mausmodell der Atemwegsentzündung soll für die Untersuchung der Fragestellungen dieser Arbeit herangezogen werden. Folgende Mausstämme wurden verwendet:

- BALB/c-Mäuse, w, 6-8 Wochen alt Harlan Winkelmann GmbH,
Borchen, D
- C57BL/6-Mäuse, w, 6-8 Wochen alt Harlan Winkelmann GmbH,
Borchen, D
- CCSP-NGF-Mäuse G.Hoyle, Tulane University
Medical Center, New Orleans,
Louisiana, USA

Die transgenen CCSP-NGF-Mäuse wurden ursprünglich aus C57BL/6- und SJL-Mäusen gezüchtet. Sie überexprimieren NGF unter der Kontrolle des CCSP (engl.: *Clara-cell secretory protein*)-Promoters der lungenspezifischen Clara-Zellen (Hoyle et al., 1998). Die lokale NGF-Überproduktion in der Lunge bewirkt eine Zunahme von Tachikinin-sezernierenden als auch von sympathischen Nervenfasern (Hoyle et al., 1998).

Die transgenen Mäuse wurden mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen gepaart. Alle Mäuse wurden unter pathogen-freien Bedingungen gehalten und bekamen Futter und Wasser *ad libitum*.

III.1.2 Genotypisierung

Material:

Ketanest 50	Parke-Davis, Berlin, D
Rompun	Bayer Chemical, Leverkusen, D
Qiagen (QIAmp DNA MiniKit)	Hilden, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agarosegel 3%	Roth, D
DNA-Leiter (100bp-Schritte)	Gibco, Karlsruhe, D

Durchführung:

Im Alter von sechs Wochen wurde der Nachwuchs der CCSP-NGF-Mäuse mit 2,6 mg Ketaminhydrochlorid (55 µl Ketanest 50) und 0,18 mg Xylazinhydrochlorid (10 µl Rompun) in 250µl steriler Kochsalzlösung narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurde ein 1 Zentimeter langes Stück Schwanz abgetrennt. Aus den Schwanzstücken wurde die DNA nach Anleitung des QIAmp DNA MiniKit isoliert.

Der Nachweis des Promotorkonstruktes erfolgte durch PCR (engl.: *polymerase chain reaction*) mittels folgender Primer-Sequenzen: 5'-CAT ACC CAC ACA TAC CCA CA-3' (aufwärts) und 5'-ACA TTA CGC TAT GCA CCT GG-3' (abwärts).

Die Bedingungen während der PCR waren:

- 94°C 5 Min. initiale Denaturierung
- 94°C 30 Zyklen (30 Sek.)
- 60°C 30 Zyklen (30 Sek.)
- 72°C 30 Zyklen (30 Sek.)
- 72°C 5 Min. finale Elongation

Resultierende Genfragmente wurden in 3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht.

Die DNA transgener Tiere (CCSP-NGF-*tg*) konnte durch das Vorhandensein eines 311 bp langen Fragmentes erkannt werden, wohingegen die Wildtypen (CCSP-NGF-*wt*) dieses Fragment nicht aufwiesen (Abb.3).

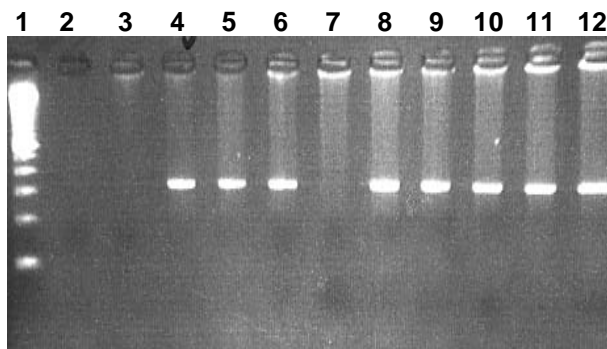


Abbildung 3: Ausschnitt aus einem ethidiumbromidhaltigen Agarose- Gel
In der ersten Spur ist die Basenpaarleiter aufgetragen, jede Bande signalisiert 100 Basenpaare. Spur 2 zeigt eine Kontrolle ohne DNA-Material, 3 zeigt die wildtyp-Kontrolle, 4 die *transgen*-Kontrolle. In Spur 5 und 6, sowie 8-12 laufen Reaktionsprodukte von CCSP-NGF-*tg*-Tieren. Spur 7 zeigt ein CCSP-NGF-*w-t* Tier.

III.2 Versuchsprotokoll

Dieser Versuchsaufbau soll dazu dienen, die zu untersuchenden Tiere in einen dem humanen Asthma bronchiale äquivalenten Zustand zu versetzen und sie daraufhin zu untersuchen. Die experimentelle Vorgehensweise unterteilt sich in vier grundsätzliche Phasen, die in Abb. 4 schematisch dargestellt sind.

1. Sensibilisierung:

Initial müssen die Tiere auf ein bestimmtes Allergen, hier OVA, sensibilisiert werden. Dies erfolgt an Tag 1, 14, und 21 mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion.

2. Provokation 1+2 aerosolisch:

An Tag 27 und 28 werden die Tiere mit dem Allergen in aerosolischer Form provoziert. Hierdurch wird eine Entzündung der Atemwege hervorgerufen.

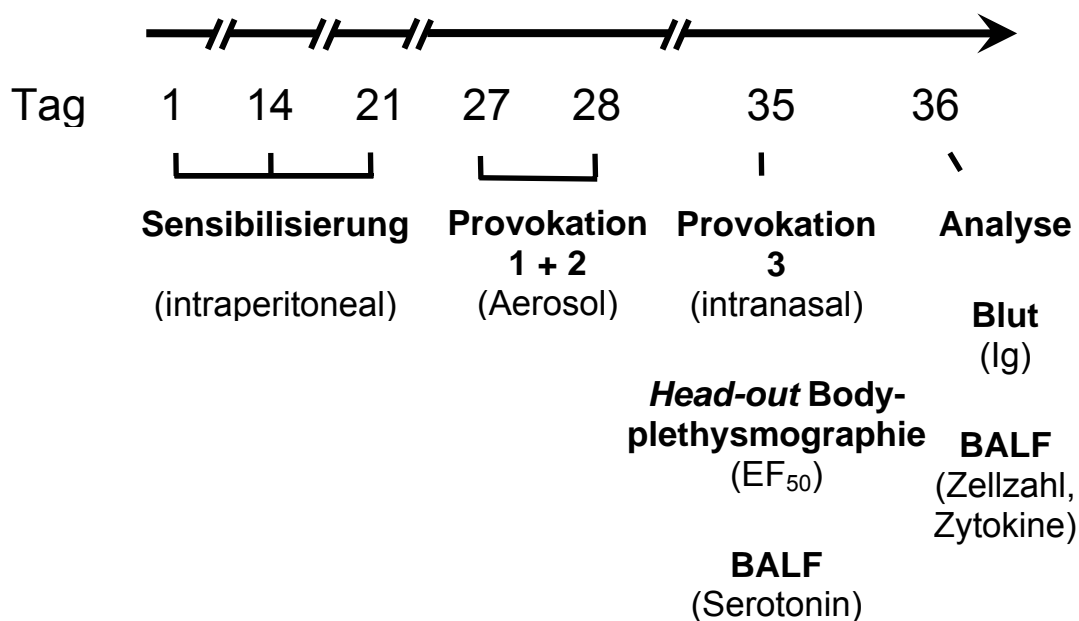
3. Provokation 3 intranasal (Protokoll 1) bzw. aerosolisch (Protokoll 2):
Diese erfolgt an Tag 35 bzw. 29. Die Reaktion in den Atemwegen wird im Bodyplethysmographen gemessen.

4. Blutentnahme und Bronchoalveoläre Lavage (BAL) (nur Protokoll 1):
An Tag 36 erfolgt bei allen Tieren eine Blutentnahme zur Untersuchung der Serum-IgE-Spiegel, sowie eine Bronchoalveoläre Lavage zum Nachweis einer Atemwegsentzündung mittels Zählung von Immunzellen und Messung von Zytokinen aus den BAL-Proben.

Die genaue Behandlung der einzelnen experimentellen Versuchsgruppen ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst und dargestellt:

Protokoll 1

zur Untersuchung von allergischer Frühphasereaktion, Atemwegsentzündung, IgE-Produktion und Serotoninfreisetzung



Protokoll 2

zur Untersuchung von Atemwegsreaktivität und sensorischer Atemwegsreagibilität

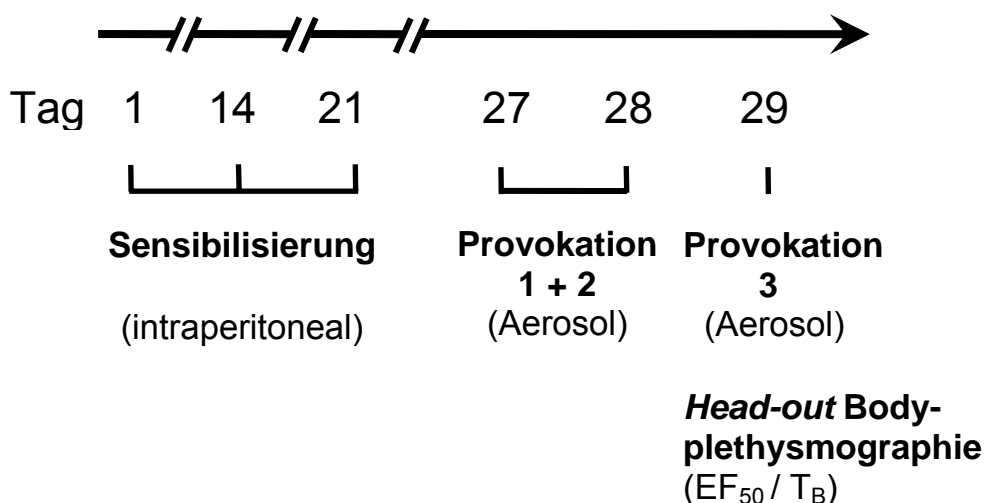


Abbildung 4: Experimentelles Design

Protokoll 1 und 2 fassen die allgemeine Behandlung der Versuchstiere zusammen. Eine detaillierte Beschreibung der Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen ist in Tabelle 1 und 2 verdeutlicht.

Tabelle 1: Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Protokoll 1

BALB/c

Gruppen	Sensibilisierung	Vorbehandlung vor Provokation 1 + 2	Provokation 1 + 2	Provokation 3
anti-NGF	OVA/Al(OH) ₃	anti-NGF	OVA	OVA
Isotyp-Kontrolle	OVA/Al(OH) ₃	Isotyp-Kontrolle	OVA	OVA
NIL				PBS

CCSP-NGF

	Gruppen	Sensibilisierung	Provokation 1 + 2	Provokation 3
<i>wt</i>	OVA	OVA/Al(OH) ₃	OVA	OVA
<i>tg</i>				
<i>wt</i>	BSA-	OVA/Al(OH) ₃	OVA	BSA
<i>tg</i>	Kontrolle *			
<i>wt</i>	PBS-	PBS/Al(OH) ₃	PBS	OVA
<i>tg</i>	Kontrolle			

* Nicht durchgeführt für Evaluation der Allergen-induzierten Serotoninspiegel in BALF

Tabelle 1: Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung, Vorbehandlung und Provokation in Protokoll 1 BSA = Bovines Serumalbumin; CCSP = sekretorischer Protein Promotor der Clarazellen (*Clara-cell secretory protein promotor*); CCSP-NGF = Überexpression von NGF unter der Kontrolle eines lungenspezifischen CCSP; NGF = Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*); anti-NGF = NGF-Antikörper; Isotyp-Kontrolle = Isotyp-Kontroll-Antikörper (IgG); NIL = unbehandelte Tiere; OVA = Ovalbumin; Al(OH)₃ = Aluminiumhydroxid; PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline*); *tg* = transgen; *wt* = wildtyp.

Tabelle 2: Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Protokoll 2

BALB/c

Gruppen	Sensibilisierung	Vorbehandlung vor Provokation 1 + 2	Provokation 1 + 2	Provokation 3
NGF	OVA/Al(OH) ₃	NGF	OVA	Methacholin
anti-NGF	OVA/Al(OH) ₃	anti-NGF	OVA	Methacholin
Isotyp-Kontrolle	OVA/Al(OH) ₃	Isotyp-Kontrolle	OVA	Methacholin
NIL				Methacholin

CCSP-NGF

Gruppen	Sensibilisierung	Provokation 1 + 2	Provokation 3
<i>wt</i>	OVA/Al(OH) ₃	OVA	Capsaicin
<i>tg</i>	OVA/Al(OH) ₃	OVA	Capsaicin

Tabelle 2: Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für Sensibilisierung, Vorbehandlung und Provokation in Protokoll 2

CCSP = sekretorischer Protein Promotor der Clarazellen (*Clara-cell secretory protein promotor*); CCSP-NGF = Überexpression von NGF unter der Kontrolle eines lungenspezifischen CCSP; NGF = Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*); anti-NGF = NGF-Antikörper; Isotyp-Kontrolle = Isotyp-Kontroll-Antikörper (IgG); NIL = unbehandelte Tiere; OVA = Ovalbumin; Al(OH)₃ = Aluminiumhydroxid; *tg* = transgen; *wt* = wildtyp.

III.2.1 Sensibilisierung

Material:

Ovalbumin (OVA), Grad VI	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
Aluminiumhydroxid Al(OH) ₃ (Inject Alum)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
PBS-Dulbecco (steril)	Seromed, Biochrom, Berlin, D
1 ml-Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Kanülen (0,4 x 20mm)	Terumo, Leuven, Belgien

Durchführung:

Sechs bis acht Wochen alten Mäusen wurde an Tag 1, 14 und 21 jeweils 200µl PBS mit 10µg OVA adsorbiert an 1,5 mg Al(OH) i.p. injiziert (Protokoll 1, 2).

Nicht immunisierte Kontrolltiere erhielten ausschließlich 1,5 mg Al(OH)₃ ohne OVA.

III.2.2 Allergen-Provokation 1 und 2 (Induktion der allergischen Entzündung)

Material:

Ovalbumin (OVA), Grad V	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
PBS-Dulbecco (steril)	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Plastikkammer (20 x 20 x 15 cm ³)	Eigenanfertigung
Düsenvernebler	Pari, Starnberg, D

Durchführung:

Der Sensibilisierung folgte an Tag 27 und 28 je eine lokale Allergenprovokation mit OVA bzw. PBS (Protokoll 1, 2). Hierzu wurden 7 ml 1%iges Ovalbumin, gelöst in PBS, 20 Minuten lang in einem Düsenvernebler aerosolisiert und kontinuierlich in eine Plastikkammer geleitet. Die Tröpfchengröße des Aerosols betrug 1-2 µm und war damit atemwegsgängig (Clay, 1983). Eine Kontrollgruppe der CCSP-NGF-Tiere erhielt aerosolisch PBS ohne OVA, um einen Effekt der bloßen Flüssigkeitsapplikation auszuschließen.

III.2.3 Intranasale anti-NGF Behandlung der BALB/c-Mäuse

Material:

Ketanest 50	Parke-Davis; Berlin, D
Rompun	Bayer Chemical, Leverkusen, D
NGF-Antiserum (Kaninchen)	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
Isotyp-Kontroll-Antiserum IgG	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
0,9 % NaCl (steril)	Braun, Melsungen, D
PBS	Seromed, Biochrom, Berlin, D

Durchführung:

Um gewährleisten zu können, dass die intranasal verabreichte Flüssigkeit tatsächlich in die Lungen gelangt, wurden die Mäuse vorher narkotisiert. Die Narkose erfolgte wie bereits unter Genotypisierung beschrieben. Nach Eintritt der Narkose wurde den BALB/c-Mäusen mit einer Pipette 2 x 25 µl anti-NGF Antiserum gelöst in PBS (1:50) oder als Kontrolle Isotyp-Kontroll-Antiserum intranasal appliziert. Da Mäuse obligate Nasenatmer sind, gelangte die Flüssigkeit in die Lunge. Die intranasale Behandlung erfolgte drei Stunden vor der aerosolischen Provokation an Tag 27 und 28.

III.2.4 Allergen-Provokation 3 (Messung von Atemwegsreaktivität und sensorischer Atemwegsreagibilität)

In Protokoll 1 erhielten die Tiere an Tag 35 während der Bodyplethysmographiemessung eine zusätzliche intranasale Allergenprovokation von 50 µl PBS mit 1% OVA. Die Mäuse waren hierbei fixiert, jedoch nicht narkotisiert. Die BSA-Kontrollgruppe erhielt statt OVA BSA intranasal, um einen rein der Proteinapplikation zuzuschreibenden Effekt auf die Atemfunktion auszuschließen. Außerdem wurde mittels einer Gruppe von gänzlich unbehandelten Tieren (NIL) einzig PBS intranasal appliziert. Hiermit sollte ausgeschlossen werden, dass messbare Effekte möglicherweise allein auf die intranasale Applikation von Flüssigkeit zurückzuführen sind.

In Protokoll 2 erhielten Tiere als 3. Provokation während der Bodyplethysmographiemessung aerosolisch Methacholin (BALB/c) bzw. Capsaicin (CCSP-NGF).

III.3 Head-out Bodyplethysmographie

Diese Methode erlaubt die kontinuierliche Aufzeichnung von Atemfluss-Mustern bei Mäusen im Wachzustand (Abb. 5). Das experimentelle Verfahren und die verwendete Ausrüstung sind im Detail von Neuhaus-Steinmetz *et al.* (Neuhaus-Steinmetz *et al.*, 2000) und das verwendete Analysenprogramm von Vijayaranathan *et al.*, 1993 und 1994 (Vijayaraghavan *et al.*, 1993, Vijayaraghavan *et al.*, 1994) beschrieben worden.

Die Daten wurden über einen Zeitraum von 14 Sekunden gesammelt und in der 15. Sekunde berechnet. Ausgewertet wurden der respiratorische Atemfluss bei 50% Tidalvolumen (EF_{50}) und die Atempause vor Expiration (T_B , engl.: *time of break*) (Abb. 6). Für die Messung wurden die Mäuse in den Bodyplethysmographie-Kammern platziert und hatten etwa 15 Minuten Zeit, sich zu adaptieren. Nach dieser Zeitspanne wurden die respiratorischen Variablen für jeden Atemzug über eine weitere Dauer von 15 Minuten bei Atmung von Raumluft gemessen. Durchschnittliche Werte \pm Standardabweichung (SD) für jede respiratorische Variable wurden berechnet. Diese Werte wurden als Ausgangslinie (*baseline*) verwendet, um Abweichungen während der Provokationsphase zu berechnen. Die Messungen erfolgten an vier Tieren gleichzeitig.

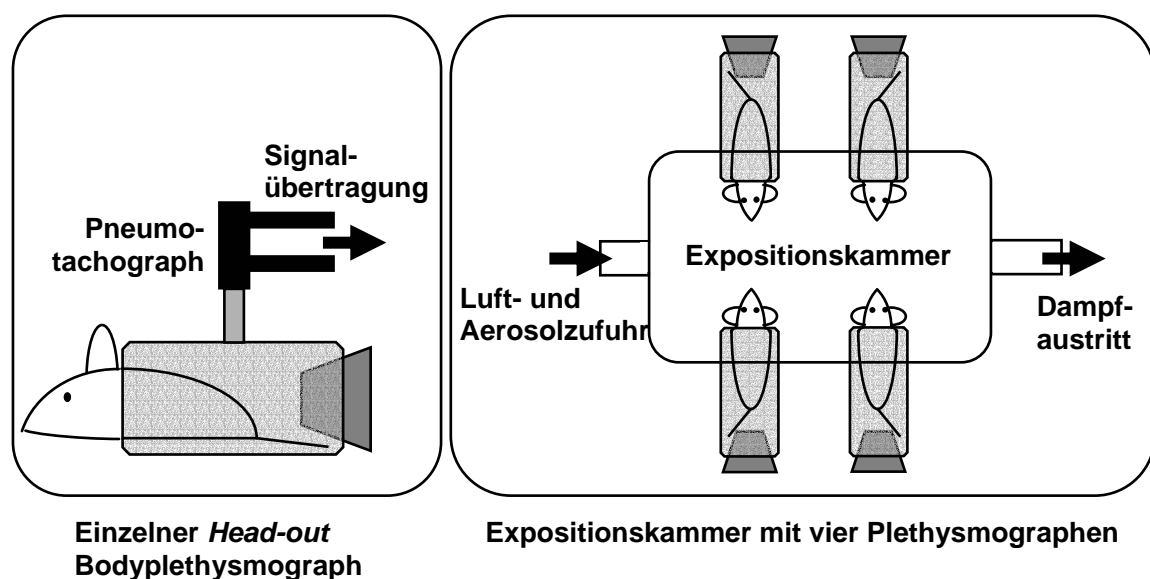


Abbildung 5: Bodyplethysmographie – schematische Darstellung

A

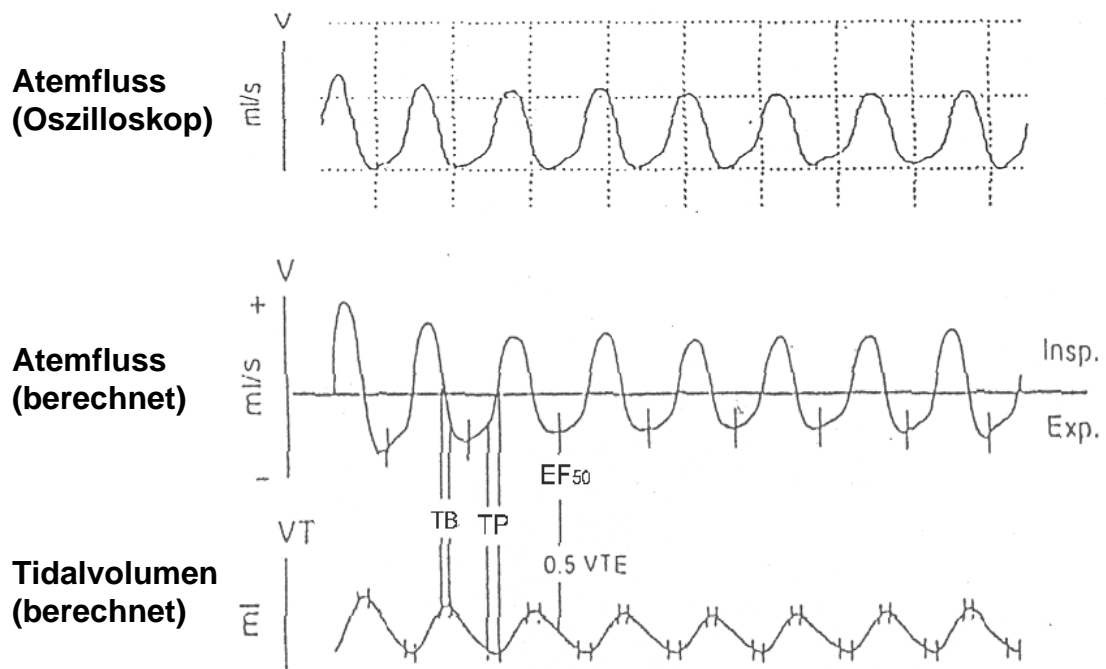


Abbildung 6 A: Normale Atmungsmuster

VT = Tidalvolumen (Atemzugvolumen): pro Atemzug bewegte Luftmenge (In- und Expiration)
 TB = *Time of break*: Atempause vor Expiration, Maß für sensorische Irritation
 TP = *Time of pause*: Atempause nach Expiration, Maß für pulmonale Irritation
 EF₅₀ = expiratorischer Atemfluss bei 50% Tidalvolumen, Maß für Atemflusseinschränkung durch verlängerte Expiration bei erhöhtem Atemwegswiderstand
 VTE = expiratorisches Tidalvolumen

B

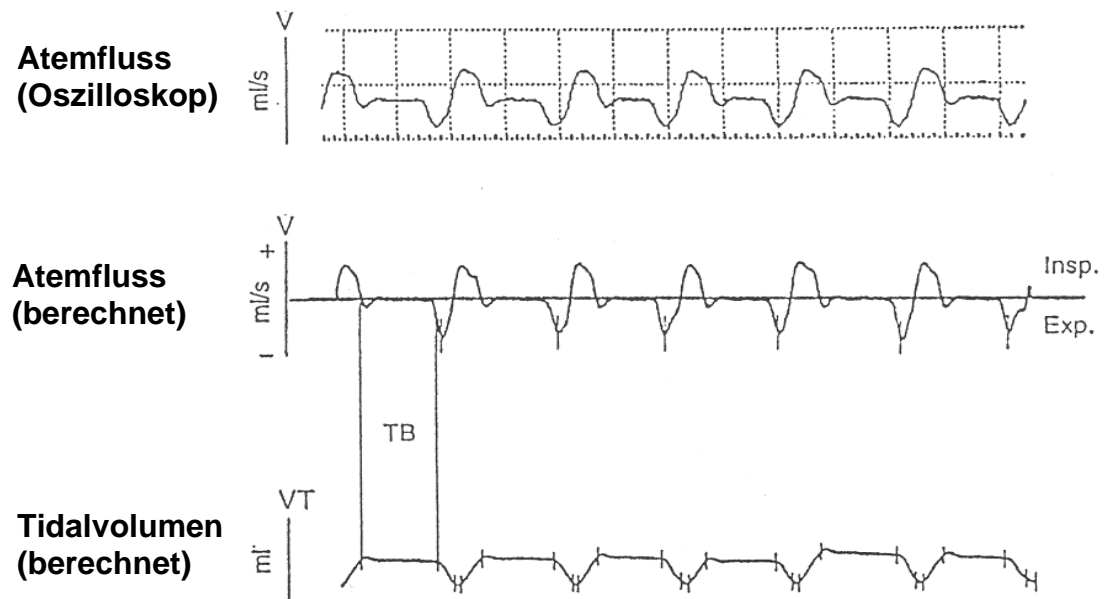


Abbildung 6 B: Sensorische Irritation der oberen Atemwege nach Stimulation mit Chlorobenzylchlorid, TB = *Time of break*: Atempause vor Expiration, Maß für sensorische Irritation

C

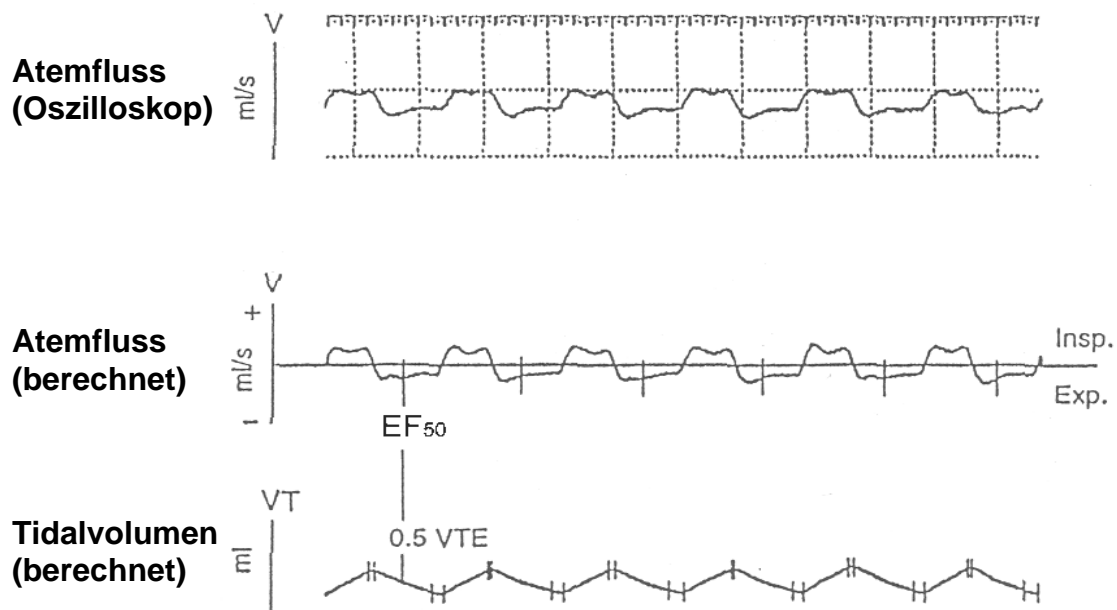


Abbildung 6 C: Atemflusseinschränkung nach Stimulation mit Methacholin, EF₅₀ = expiratorischer Atemfluss bei 50% Tidalvolumen, Maß für Atemflusseinschränkung durch verlängerte Expiration bei erhöhtem Atemwegswiderstand

III.3.1 Bestimmung von allergischer Frühphasereaktion und Atemwegsreaktivität

Material:

Head-out Bodyplethysmograph

Ovalbumin (OVA), Grad V

Sigma Chemie, Deisenhofen, D

PBS

Seromed Biochrom, Berlin, D

Methacholin-Aerosol

Durchführung:

Als Maß für die Allergen- und Methacholin-induzierten Einschränkungen des Atemflusses wurde der expiratorische Atemfluss bei 50 % Tidalvolumen bestimmt (EF₅₀). Die Lungenfunktion wurde kontinuierlich unter Verwendung des *Head-out Bodyplethysmographen* erfasst (Finotto et al., 2001, Glaab et al., 2001, Neuhaus-Steinmetz et al., 2000).

Die allergische Frühphasereaktion wurde an unbetäubten Tieren durch eine intranasale Provokation an Tag 35 induziert (Protokoll 1). Nach 15 Minuten Eingewöhnungsphase und 15 Minuten Messung der Ausgangslinie erfolgte die

intranasale Applikation des Allergens bzw. PBS oder PBS mit BSA bei den Kontrollgruppen. Die unbetäubten Tiere mussten hierbei einzeln aus der Expositions-kammer herausgenommen werden, um ihnen, in der Röhre fixiert, die Flüssigkeit von 2 x 2 µl in die Nase pipettieren zu können. In den darauf folgenden 30 Minuten wurde die Frühphasereaktion, also die direkte Atemwegsreaktion auf die Allergenapplikation gemessen.

Die Atemwegsreaktivität, ausgelöst durch die Kontraktion glatter Muskelzellen, wurde an Tag 29 (Protokoll 2) während der aerosolischen Verabreichung des neuronalen Rezeptoragonisten Methacholin gemessen. Bei Inhalation wirkt dieses auf die glatte Muskulatur in den Atemwegen und kann bei bestehender AHR eine Atemwegskonstriktion auslösen. Methacholin gilt somit als Marker für die Empfindlichkeit glatter Muskelzellen. Nach der Evaluation der Ausgangslinie wurden die Tiere mit Methacholin provoziert. Die Applikation erfolgte über einen Vernebler als Aerosol in steigenden Konzentrationen von 25, 50, 75 und 100 mg/ml PBS über einen Zeitraum von jeweils einer Minute.

III.3.2 Bestimmung der sensorischen Reagibilität

Material:

Head-out Bodyplethysmograph

Capsaicin

PBS

Seromed, Biochrom, Berlin, D

Ethanol 10%

Durchführung:

Gemessen wurde als Maß für die Reagibilität der sensorischen Neurone die Atempause vor der Expiration (*time of break*, T_B) in Abhängigkeit von der lokalen Provokation durch das Nervenstimulanz Capsaicin. Dieses wirkt über Vanilloid-Rezeptoren, die einzig von sensorischen Neuronen exprimiert werden, und bewirkt dort die Sekretion von Tachykininen wie SP. An Tag 29 wurde eine *Head-out* Bodyplethysmographiemessung durchgeführt. Den Tieren wurde während der Messung in steigenden Konzentrationen Capsaicin, gelöst in PBS mit 10% Ethanol, aerosolisch verabreicht. Die Konzentrationen

von 10, 50, 100, 500 und 1000 µg/ml wurden jeweils eine Minute lang vernebelt.

III.4 Serumgewinnung

Zur Messung der Immunglobulin- und Zytokinpiegel im Serum wurde den Tieren an Tag 36, also 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation, ca. 500 µl Blut aus den Schwanzvenen entnommen. Um sicherzustellen, dass OVA-spezifische IgE-Spiegel in unbehandelten Tieren noch nicht nachzuweisen sind, wurde an Tag -1 (vor Versuchsbeginn) eine Blutprobe gewonnen.

Das Blut wurde 20-30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt, um gerinnen zu können. Anschließend wurde das Blut zehn Minuten zentrifugiert (1200 x g, RT). Nach der Zentrifugation wurde das Serum abgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei -20°C zur weiteren Analyse gelagert.

III.5 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Material:

PBS	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Kanülenspitzen (0,55 x 25 mm)	Terumo, Leuven, Belgien

Durchführung:

Im Anschluss an die Blutentnahme an Tag 36 wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde die Trachea der Mäuse für die BAL freipräpariert. Daraufhin erfolgte die bronchoalveoläre Spülung, indem die Trachea unter Sichtkontrolle mit einer leicht gebogenen Kanülenspitze punktiert, 2 x 0,8 ml gekühltes PBS injiziert und im gleichen Zuge wieder aspiriert wurde. Dabei konnten ca. 1,4 +/- 0,2 ml BAL-Flüssigkeit (BALF) pro Maus zurückgewonnen werden. BALF-Proben unter 1,2 ml Volumen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die BALF-Proben wurden auf Eis zwischengelagert und anschließend wie folgt verteilt: Eine Portion wurde zentrifugiert (250 x g, 4°C). Der Überstand wurde auf Eis aliquotiert und bei -20°C bis zur Messung der Zytokine gelagert.

Die andere Portion der BALF wurde dazu verwendet, die Gesamtzellzahl zu bestimmen und ein Zytospin durchzuführen nach *Herz et al., 1998* (Herz et al., 1998).

BALF-Proben zur Bestimmung der Serotoninspiegel wurden 15 Minuten nach der letzten Allergen-Provokation an Tag 35 mit 1 x 0,8 ml eisgekühltes PBS als Spülflüssigkeit gewonnen. Nur Überstände von Proben mit einem Flüssigkeitsvolumen von mindestens 0,7 +/-0,1 ml wurden mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) gemessen.

III.5.1 Zytospin

Mit 50 µl der BALF wurde jeweils ein Zytospin durchgeführt. Dabei wurden die Zellen fünf Minuten lang bei 100 x g auf einen Objektträger zentrifugiert und anschließend ca. 30 Minuten lang getrocknet. Für die Zählung von Eosinophilen, Neutrophilen, Lymphozyten und Makrophagen wurden die Zellen zur besseren Unterscheidung mit Quick Diff (Baxter Dade, Düdlingen, Schweiz) angefärbt. Die Zählung erfolgte mikroskopisch nach morphologischen Kriterien an 2 x 100 Zellen bei einer 100fachen Vergrößerung.

III.6 Messung der Zytokine und Immunglobuline mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Material:

96-well-Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden, D
Natriumbicarbonat (0,1 M, pH 8,2)	Serva, Heidelberg, D
Waschpuffer, pH 7,2:	
PBS	
0,1% Tween 20	Sigma, Deisenhofen, D
Blockpuffer:	
PBS	
3% Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, D
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem, Bad Soden, D
Tetramethylbenzidin (TMB) (100 mM) in:	Fluka, Neu-Ulm, D
50% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
50% Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Gallatipuffer, pH 3,95	
200 mM Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, D
4 M Kaliumhydroxidlösung	Merck, Darmstadt, D
0,1‰ Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D
2 M Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
Verdünnungspuffer (PBS, 3% BSA, 0,1% Tween)	
Schüttler (IKA-Schüttler MTS 4)	
Dynatech MR 7000-Photometer	Dynatech, Denkdorf, D

III.6.1 Bestimmung der Zytokine aus BALF

Monoklonale Antikörper

gegen Zytokine IL-4, IL-5 und IFN- γ Pharmingen, Hamburg, D

Primäre Antikörper:

- anti-Maus IL-4 (Ratte IgG₁)
- anti-Maus IL-5 (Ratte IgG₁)
- anti-Maus IFN- γ (Ratte IgG₁)

Sekundäre (biotinylierte) Antikörper:

- anti-Maus IL-4 (Ratte IgG2a)
- anti-Maus IL-5 (Ratte IgG2a)
- anti-Maus IFN- γ (Ratte IgG2a)

Standards:

- rekombinantes IL-4 (Maus)
- rekombinantes IL-5 (Maus)
- rekombinantes IFN- γ (Maus)

verwendete Konzentrationen:

Primäre Antikörper:

- anti-IL-4 1 $\mu\text{g/ml}$
- anti-IL-5 2 $\mu\text{g/ml}$
- anti-IFN- γ 3 $\mu\text{g/ml}$

Sekundäre Antikörper:

- IL-4 0,25 $\mu\text{g/ml}$
- IL-5 1 $\mu\text{g/ml}$
- IFN- γ 0,1 $\mu\text{g/ml}$

Standards:

- IL-4 4 ng/ml – 10 pg/ml
- IL-5 4 ng/ml – 4 pg/ml
- IFN- γ 10 ng/ml – 19,5 pg/ml

Durchführung :

96-well-Rundbodenplatten wurden mit dem entsprechenden primären Antikörper beschichtet, (50 $\mu\text{l/well}$). Nach Übernachtinkubation bei 4°C wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit Blockpuffer zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben und die Standardreihe (je 50 $\mu\text{l/well}$) in Duplikaten auf die Platten aufgetragen, für zwei Stunden auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert und erneut fünfmal gewaschen, um nicht gebundene Proben zu entfernen. Daraufhin wurde der biotinylierte sekundäre AK hinzu gegeben (50 $\mu\text{l/well}$) und eine Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (5x) wurden die Platten mit Streptavidin-Peroxidase

30 Minuten bei RT in dunkler Umgebung inkubiert (Verdünnung 1:10.000 in Blockpuffer, 50 µl/well), was zu einer spezifischen Bindung des Enzymkomplexes an das Biotin des sekundären AK führte. Anschließend wurden die Platten wieder gewaschen und für die Reaktion das Substrat Tetramethylbenzathidin (verdünnt 1:100 in Gallati-Puffer, 150 µl/well) auf die Platten gegeben und wieder im Dunkeln bei RT inkubiert. Es zeigte sich eine blaue Verfärbung in Abhängigkeit von der Menge der gebundenen Zytokine. Die Reaktion wurde nach ca. 15 Minuten durch die Zugabe von 2M Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb beobachtet werden konnte. Die Messung der Platten erfolgte photometrisch bei 450/620 nm (Testfilter/Referenzfilter). Die Konzentration der zu bestimmenden Substanz wurde über die mitgemessene Standardkurve berechnet.

III.6.2 Messung der Immunglobuline aus dem Serum

Ovalbumin, Grad VI	Sigma, Deisenhofen, D
Primäre Antikörper:	
anti-Maus IgE	Binding Site, Heidelberg, D
Sekundäre (biotinylierte) Antikörper:	
anti-Maus-IgE	Pharmingen, Hamburg, D
Standards:	
IgE (250 ng/ml)	Pharmingen, Hamburg, D
Standardserum (Pool aus Seren OVA-sensibilisierter Balb/c-Mäuse)	
Zentrifuge	

Verwendete Konzentrationen:

Primäre Antikörper:

 IgE 1:1500 in PBS

 OVA VI * 20 µg/ml

Sekundäre Antikörper:

 IgE 2,5 µg/ml

Verdünnung der Proben OVA-sensibilisierter Tiere:

 IgE 1:100

Verdünnung der Proben nicht sensibilisierter Tiere:

IgE 1:3 oder unverdünnt

Standards:

IgE 250 ng/ml – 0,7 ng/ml

anti-OVA IgE 2000 LU – 3,906 LU

Durchführung: wie in II.6.1 beschrieben

* Für OVA-spezifische Immunglobuline wurden die Platten anstelle des primären Antikörpers mit OVA VI beschichtet.

III.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder als individuelle Datenpunkte und Median präsentiert. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels t-Test (Abb. 8, 9, 10, 12) oder *one-way* ANOVA mit Bonferroni Post Test bestimmt (Abb. 7B, 13, 14). Die Kurven in Figur 7A wurden zur besseren Anschaulichkeit über den Durchschnitt der 13 nächsten Nachbarn geglättet.

IV ERGEBNISSE

IV.1 Allergische Frühphasereaktion

Um die Rolle von NGF an der Entwicklung der allergischen Frühphasereaktion zu beurteilen, wurde der Effekt sowohl einer Blockierung als auch einer Überexpression von NGF auf den expiratorischen Atemfluss bei 50% Tidalvolumen (EF₅₀) gemessen. Die Induktion der Frühphasereaktion erfolgte an Tag 35 parallel zu einer Bodyplethysmographiemessung durch intranasale Provokation der Versuchstiere.

IV.1.1 Abschwächung der allergischen Frühphasereaktion durch Anti-NGF

Gegen OVA sensibilisierte BALB/c-Mäuse wurden vor der Allergenprovokation lokal mit NGF-Antiserum (Anti-NGF) oder einem Isotypkontroll-Antikörper (IgG) vorbehandelt. Als Kontrolle wurden gänzlich unbehandelte, d.h. nicht sensibilisierte, nicht provozierte BALB/c-Mäuse nasal mit PBS behandelt, um den Effekt der Flüssigkeitsapplikation *per se* auf den expiratorischen Atemfluss bemessen zu können. Die Mäuse der Isotyp-Kontrolle sowie die mit anti-NGF behandelten Tiere reagierten unmittelbar auf die nasale Applikation von OVA mit einem ausgeprägten Abfall im EF₅₀-Wert ($p < 0,001$). Während in der Isotyp-Kontrollgruppe die signifikante Atemflusseinschränkung für mindestens 25 Minuten anhielt, regenerierte sich die Anti-NGF-Gruppe bereits nach 15 Minuten wieder auf das Niveau der PBS-Kontrollen (Abb. 7A und 7B).

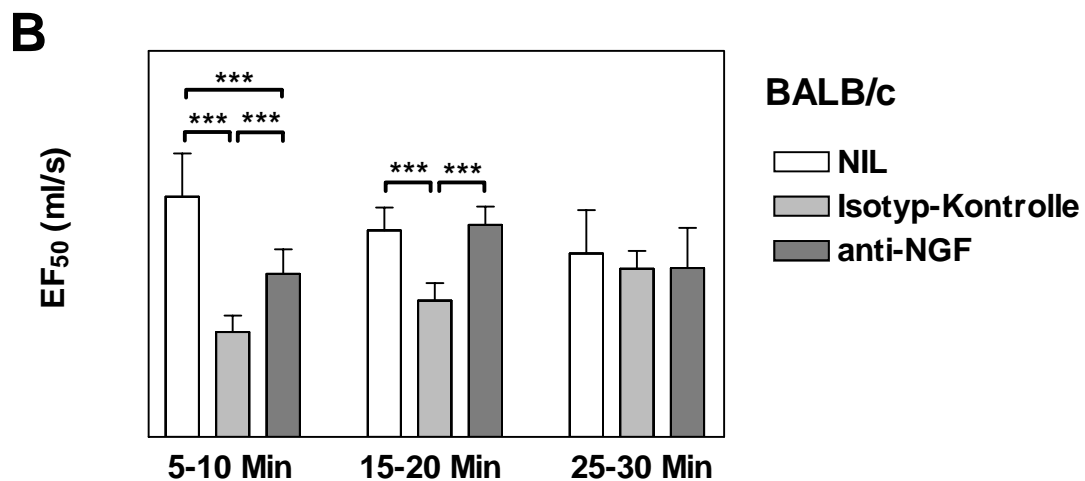
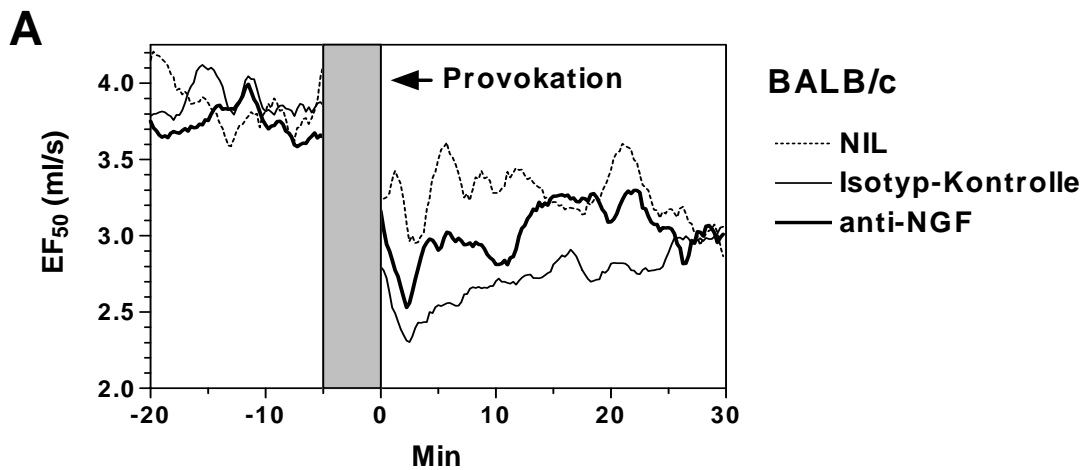


Abbildung 7: Allergische Frühphasereaktion in BALB/c-Mäusen, gemessen mittels Bodyplethysmographie an Tag 35 nach Protokoll 1 (s. Material und Methoden)

A Durchschnittlicher Atemfluss bei EF₅₀ in BALB/c-Mäusen vor und nach nasaler Applikation von PBS (NIL-Gruppe) bzw. OVA verdünnt in PBS (Isotyp-Kontroll- oder anti-NGF-Gruppe). Die Kurven zeigen die nach dem Verfahren der 13 nächsten Nachbarn geglätteten Mittelwerte aller Mäuse einer Versuchsgruppe. Individuelle Datenpunkte wurden alle 0,25 Minuten aufgezeichnet. Die graue Fläche repräsentiert die Dauer der intranasalen Provokation, in der keine Aufzeichnung möglich war.

B Statistische Analyse der Kurven aus Graphik A. Die Säulen stellen die Mittelwerte +/- SD des angegebenen Zeitraums dar.

NIL, n = 12; Isotyp-Kontrolle, n=16; anti-NGF, n = 16; *** p < 0,001

IV.1.2 Verstärkung der allergischen Frühphasereaktion durch lokale NGF-Überproduktion in der Lunge

Wie bei den BALB/c-Mäusen war die allergische Frühphasereaktion auch in sensibilisierten und provozierten CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen induzierbar (Abb. 8). In allen Versuchsgruppen zeigten die CCSP-NGF-*tg* ein signifikant erhöhtes Maß an expiratorischer Atemflusslimitierung gegenüber den Wildtypen ($p < 0,001$). Am deutlichsten war dies bei der OVA-Gruppe zu beobachten. Aber auch innerhalb der Kontrollgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und transgenen Tieren. So war weder in der PBS- noch in der BSA-Kontrollgruppe bei den wildtyp-Tieren eine allergische Frühphasereaktion auslösbar, wohingegen die transgenen Artgenossen auch hier schon einer erheblichen expiratorischen Atemflusslimitierung unterlagen.

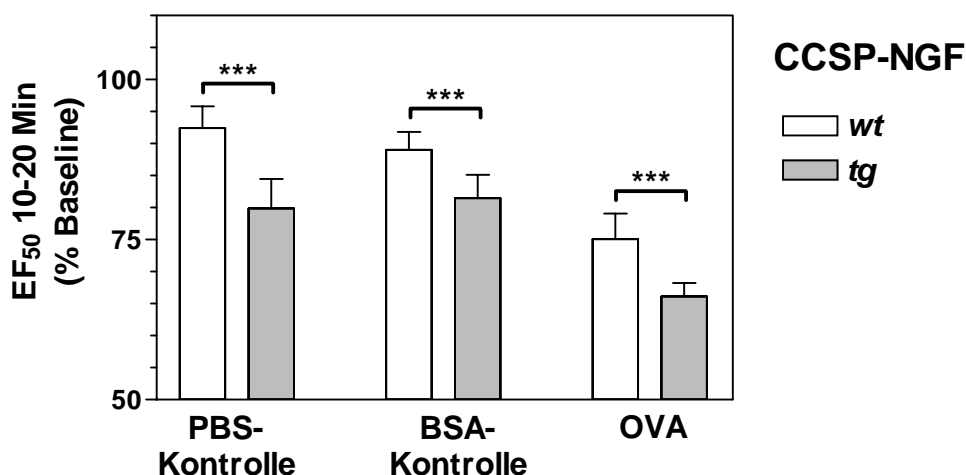


Abbildung 8: Allergische Frühphasereaktion in CCSP-NGF-Mäusen, gemessen mittels Bodyplethysmographie an Tag 35 nach Protokoll 1 (s. Material und Methoden)
Statistische Analyse der allergischen Frühphasereaktion bei CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen innerhalb 10 bis 20 Minuten nach intranasaler Provokation mit 50 μ l OVA, verdünnt in PBS (PBS-Kontroll- und OVA-Gruppe) oder BSA (BSA-Kontrollgruppe). Die Säulen repräsentieren die auf die Basislinie bezogenen relativen prozentualen Mittelwerte der individuellen Datenpunkte des angegebenen Zeitraums.
CCSP-NGF-*wt*, n = 12; CCSP-NGF-*tg*, n = 12; *** $p < 0,001$

IV.2 Verstärkung der Atemwegsentzündung durch NGF, Abschwächung durch Anti-NGF

Um Rückschlüsse auf eine allergische Entzündung der Atemwege zu ziehen wurde die BALF auf Zahl und Verteilung von Leukozyten-Subpopulationen, insbesondere auf Eosinophile als Hinweis auf eine allergische Beteiligung hin untersucht. Außerdem wurden die Spiegel der Zytokine IL-4, IL-5 als Marker einer Th2-Immunreaktion und die des IFN- γ als Zytokin der Th1-Immunantwort gemessen.

Am Tag nach der letzten Provokation mit OVA war bei den mit anti-NGF behandelten allergisierten BALB/c-Mäusen im Vergleich zu den Isotyp-Kontrollen die Zahl der in die Atemwege eingewanderten Eosinophilen signifikant herabgesetzt ($p < 0,01$), während die Zahl der Makrophagen, Lymphozyten und Neutrophilen unverändert blieb (Abb. 9A). Weiterhin zeigte sich in der anti-NGF-Gruppe, dass die lokale Produktion von IL-4 und IL-5 signifikant reduziert war ($p < 0,001$), wohingegen die IFN- γ -Spiegel keinerlei Beeinträchtigung zeigten (Abb. 10).

Umgekehrt zu den Effekten der anti-NGF-Behandlung zeigten mit OVA sensibilisierte und provozierte CCSP-NGF-*tg*-Mäuse (OVA-Gruppe) im Vergleich der zu den CCSP-NGF-*wt* insgesamt eine signifikant erhöhte Einwanderung von Eosinophilen, Lymphozyten und Neutrophilen ($p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,05$) (Abb. 9B).

Die mit OVA sensibilisierte und provozierte BSA-Kontrollgruppe wurde mit BSA provoziert und diente als Kontrolle für unspezifische Reaktionen auf die Behandlung mit Proteinen an sich. In dieser Gruppe unterschied sich die Zahl der Eosinophilen nicht wesentlich zwischen transgenen und wildtyp-Tieren (Abb. 9C). Interessanterweise ist bei allergisierten CCSP-NGF-*tg*-Mäusen sowohl in der OVA- als auch der BSA-Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Zahl der Lymphozyten erkennbar ($p < 0,001$ und $p < 0,01$) (Abb. 9B,C). Da diese Erhöhung in beiden Gruppen ähnlich aussah, scheint die gesteigerte Einwanderung der Lymphozyten also eher auf den aerosolischen OVA-

Provokationen an Tag 27 und 28 begründet zu sein, als auf die nasale Provokation an Tag 35.

Als weitere Kontrolle zeigten die nicht-sensibilisierten PBS-Kontrollen weder bei den CCSP-NGF-*tg* noch bei den Wildtypen Anzeichen einer Einwanderung von Eosinophilen in die Atemwege (Abb. 9D). Hier ist das Gesamtzellbild überwiegend von der Zahl der natürlich in den Atemwegen vorkommenden Makrophagen bestimmt. Dies zeigt, dass diese Gruppe keine Allergen-induzierte Atemwegsentzündung aufweist. In allen CCSP-NGF-Gruppen ist außerdem ein geringer Influx von Neutrophilen zu beobachten (Abb. 9B,C,D), der darauf hinweist, dass es durch die nasale Applikation von Flüssigkeit bei allen Tieren zu einer leichten unspezifischen Entzündung in den Atemwegen kommt. Weiterhin ist bei den CCSP-NGF-*tg*-Mäusen der OVA- und BSA-Gruppe eine erhöhte Einwanderung von Lymphozyten zu beobachten. Da diese Einwanderung in beiden Fällen gleich hoch ist, scheint es sich hier am ehesten um eine Folge der Sensibilisierung zu handeln, die nicht erst durch die nasale OVA-Provokation am Vortag induziert wurde.

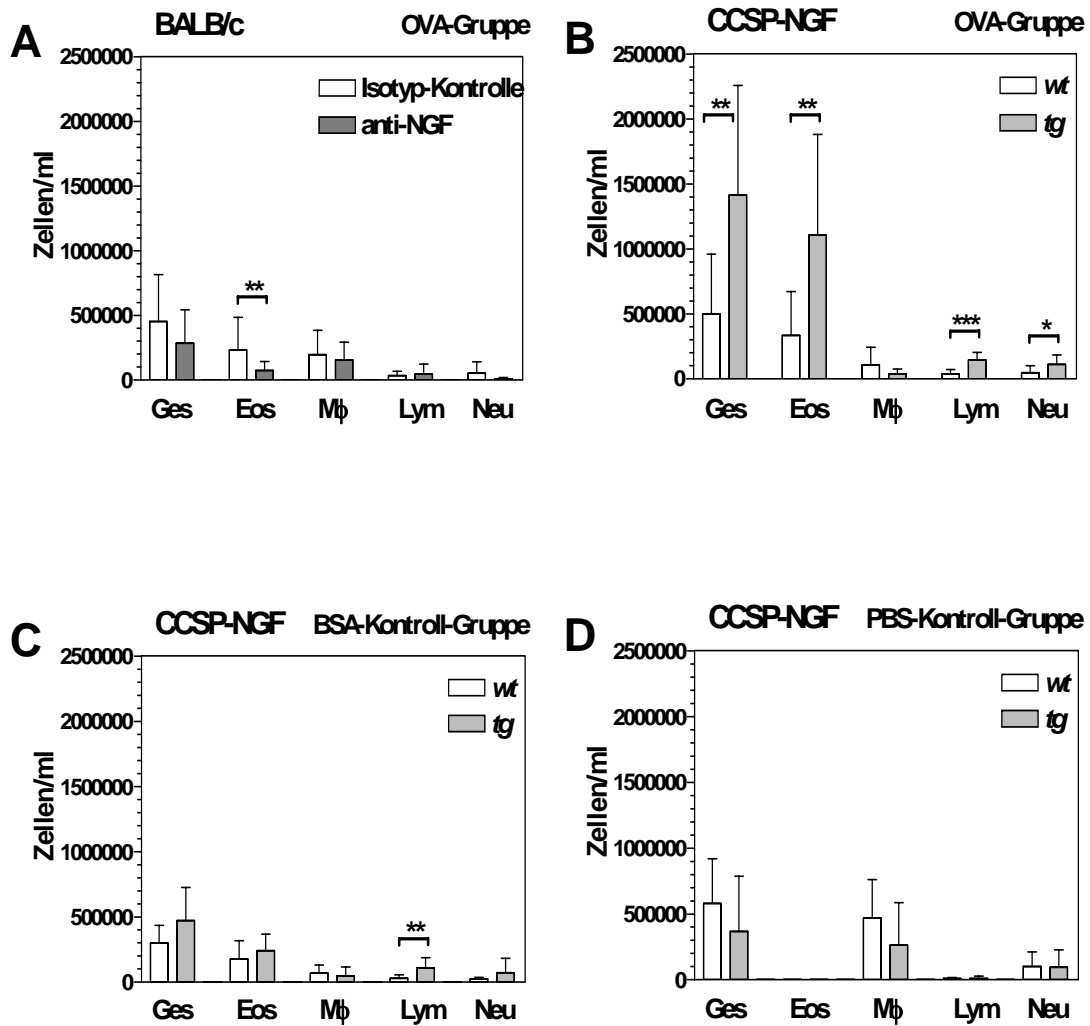


Abbildung 9 A-D: Differenzierung und Zahl von Zellen aus BALF, gewonnen von BALB/c- (A), CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen (B-D) an Tag 36, 24 Stunden nach der letzten Provokation nach Protokoll 1. Die Säulen stellen die Mittelwerte +/- SD dar. Isotyp(IgG)-Kontrolle und anti-NGF: n = 16; CCSP-NGF-*wt* und CCSP-NGF-*tg*: n = 12; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Ges: Gesamt; Eos: Eosinophile; Mφ: Makrophagen; Lym: Lymphozyten; Neu: Neutrophile

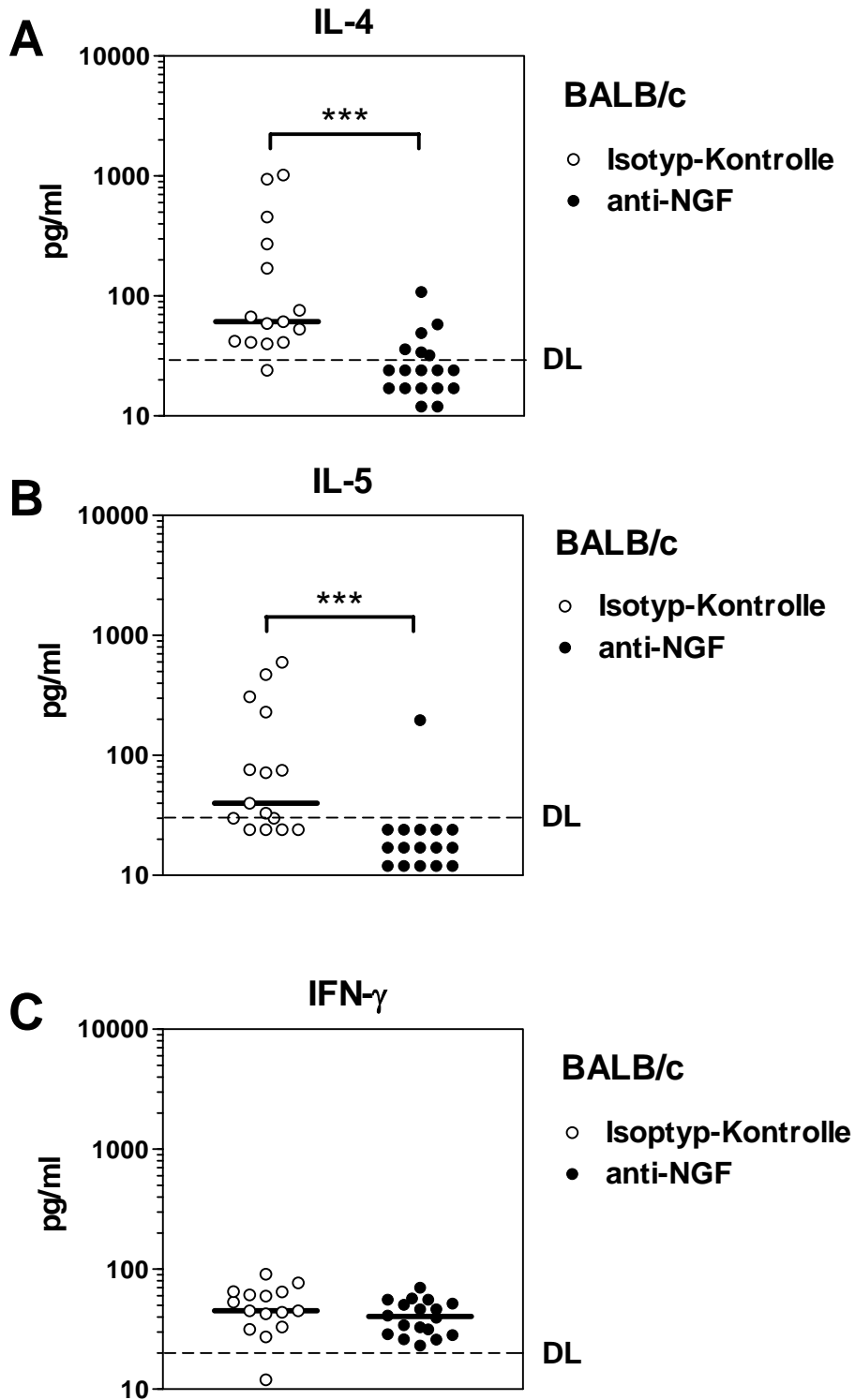


Abbildung 10 A-C: Zytokinspiegel in BALF, gewonnen an Tag 36 von BALB/c-Mäusen, vorbehandelt mit entweder Isotyp (IgG)-Kontroll- oder anti-NGF-Antikörpern nach Protokoll 1. Die Streudiagramme stellen einzelne BALF-Proben sowie den jeweiligen Median aus den Datenpunkten der beiden Versuchsgruppen dar. Die gestrichelten Linien zeigen das Detektionslimit (DL) an.

Isotyp-Kontrolle: n = 15; anti-NGF: n = 18; *** p < 0,001.

IV.3 Keine Unterschiede in IgE-Serumspiegeln

Eine mögliche Ursache, durch welche NGF die allergische Frühphasereaktion zu beeinflussen vermag, könnte eine veränderte IgE-Produktion sein. Um diesen möglichen Mechanismus zu prüfen, wurde den gemäß Protokoll 1 behandelten Tieren an Tag 36 Blut entnommen, um die Spiegel des gesamten und des Allergen (OVA)-spezifischen IgE zu bestimmen.

In BALB/c-Mäusen hatte die Behandlung mit anti-NGF keine Auswirkungen auf die IgE-Spiegel. Sowohl Gesamt-IgE- als auch OVA-spezifische IgE-Spiegel zeigten keine Unterschiede zur Isotyp-Kontrolle. Obwohl CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäuse verglichen mit den BALB/c-Mäusen insgesamt niedrigere IgE-Spiegel aufwiesen, wurden dennoch keine Unterschiede zwischen den CCSP-NGF-Versuchsgruppen festgestellt (Abb. 11). Auch die nicht sensibilisierten CCSP-NGF-Mäuse zeigten innerhalb der Gruppen keine Unterschiede. Jedoch befanden sich ihre IgE-Spiegel insgesamt tiefer als bei den sensibilisierten CCSP-NGF-Tieren (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle war nachgewiesen, dass OVA-spezifische IgE-Spiegel sich einen Tag vor Beginn der experimentellen Behandlung unter dem Detektionslimit befanden (Daten nicht gezeigt).

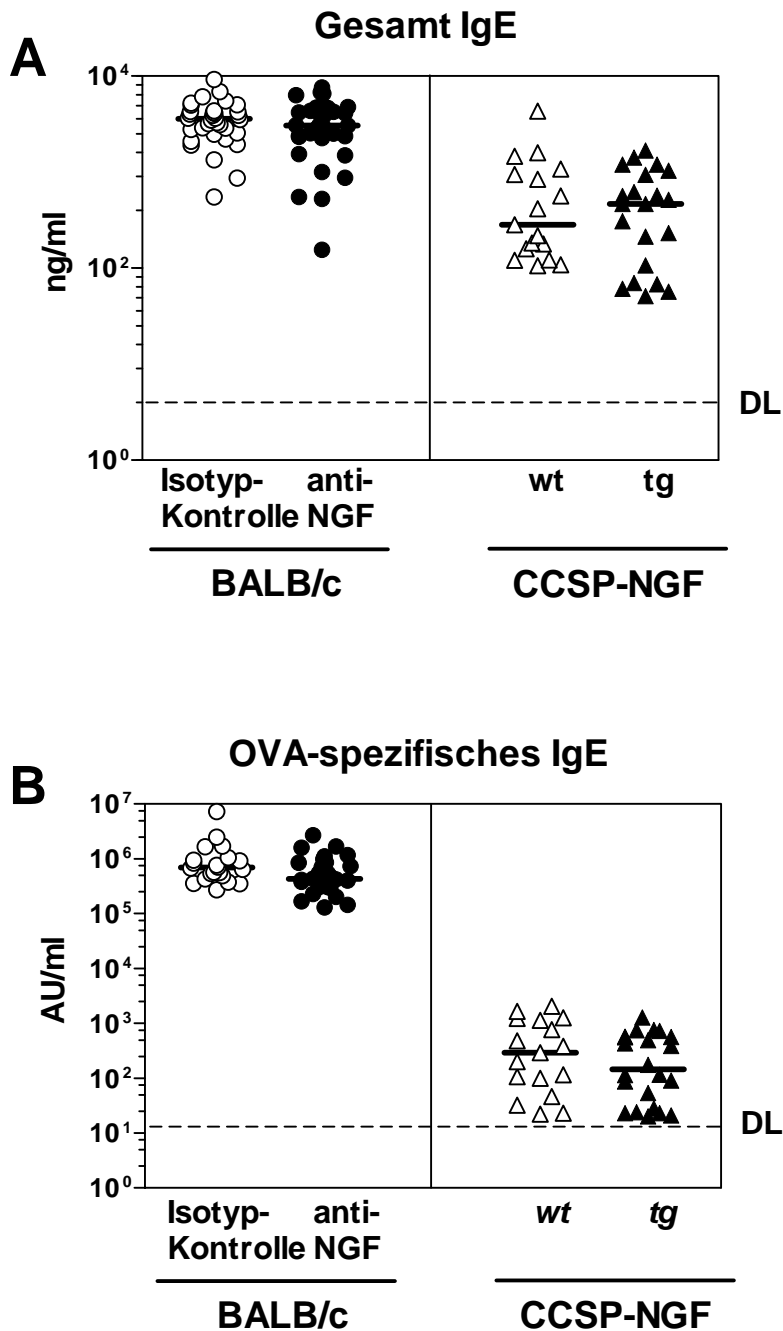


Abbildung 11: Spiegel von Gesamt- (A) und OVA-spezifischem IgE (B) in Serumproben von BALB/c-Mäusen, vorbehandelt mit Isotyp (IgG)-Kontroll- oder anti-NGF-Antikörpern, sowie von CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen, gemessen an Tag 36 gemäß Protokoll 1. Die Streudiagramme stellen einzelne Serumproben sowie den jeweiligen Median aus den Datenpunkten der Versuchsgruppen dar. Die gestrichelten Linien zeigen das Detektionslimit (DL) an. Isotyp-Kontrolle: n = 34; anti-NGF: n = 35; CCSP-NGF-*wt*: n = 21; CCSP-NGF-*tg*: n = 17; AU: willkürliche Einheiten (engl. *arbitrary units*).

IV.4 Verstärkte Serotoninfreisetzung in CCSP-NGF-*tg*-Mäusen

Um festzustellen, ob NGF eine Mastzelldegranulation und so die Freisetzung von Mediatoren zu regulieren vermag, wurden in den BALF von CCSP-NGF-Mäusen an Tag 35 gemäß Protokoll 1, unmittelbar nach der letzten Allergen-Provokation, die Spiegel des Mastzellmediators und Hauptmediators in Mäusen Serotonin gemessen. Die Ausgangslinie wurde aus Werten der PBS-Kontrollgruppe nach intranasaler Allergen-Provokation berechnet. Diese Werte lagen bei 1,45 +/- 0,43 ng/ml (Mittelwert +/- SD) für CCSP-NGF-*wt*- und 1,10 +/- 0,42 ng/ml für CCSP-NGF-*tg*-Gruppen. Hier zeigten sich bei den wildtyp-Tieren keine höheren Ausgangswerte als bei ihren transgenen Artgenossen (Daten nicht signifikant). Nach Normalisierung auf den jeweiligen Ausgangswert zeigten sensibilisierte und intranasal mit OVA provozierte CCSP-NGF-*tg*-Mäuse eine signifikante Erhöhung der Serotoninfreisetzung gegenüber der wildtyp-Gruppe ($p < 0,05$) (Abb.12).

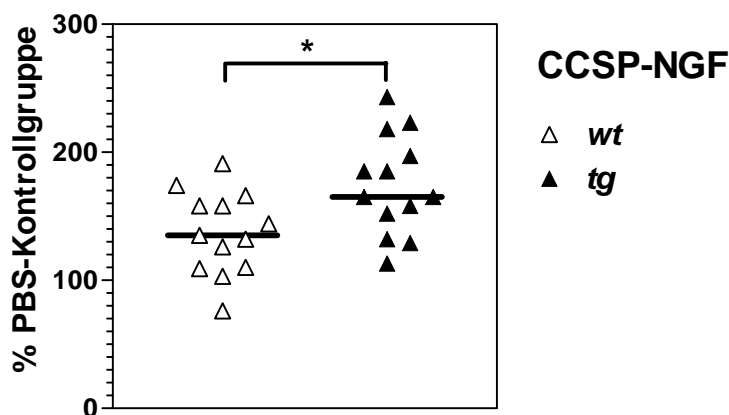


Abbildung 12: Serotoninspiegel in BALF von CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen unmittelbar nach intranasaler Allergen-Provokation an Tag 35 nach Protokoll 1. Gezeigt sind die Werte der einzelnen Mäuse. Die Querbalken kennzeichnen den jeweiligen Median. Die Serotoninwerte sind in Prozent des Mittelwertes der PBS-Kontrolltiere dargestellt. Die Werte vor Provokation waren: *wt*: 1,45 +/- 0,43 ng/ml; *tg*: 1,10 +/- 0,42 ng/ml (nicht signifikant). Alle Gruppen: n = 13; * $p < 0,05$.

IV.5 Keine Beeinflussung der Atemwegsreaktivität durch Anti-NGF

Die Auswirkung einer Behandlung von anti-NGF bzw. NGF auf die Atemwegsreaktivität wurde in allergisierten (Protokoll 2) BALB/c-Mäusen mittels aerosolischer Provokation mit Methacholin (Mch), Marker für die Empfindlichkeit glatter Muskelzellen, gemessen (Abb. 13). Bei Inhalation wirkt dieses auf die glatte Muskulatur in den Atemwegen und kann bei bestehender AHR eine Atemwegskonstriktion auslösen. Bestimmt wurde der EF₅₀-Wert als Maß der Atemflusseinschränkung durch erhöhten Atemwegswiderstand, sprich der Bronchokonstriktion. Im Vergleich zu unbehandelten NIL-Mäusen zeigten die allergisierten Tiere, bedingt durch die allergische Atemwegsentszündung, eine leichte Verringerung des Atemflussvolumens, die für hohe Mch-Konzentrationen signifikant war ($p < 0,01$ und $p < 0,001$). Zwischen den allergisierten Mäusen der IgG-, anti-NGF- und NGF-Gruppe wurden keine Unterschiede beobachtet. Dies legt dar, dass die Entwicklung von Methacholin-induzierter Atemwegshyperreaktivität in allergisierten Mäusen weder von einer Behandlung mit anti-NGF noch mit NGF beeinflusst wird.

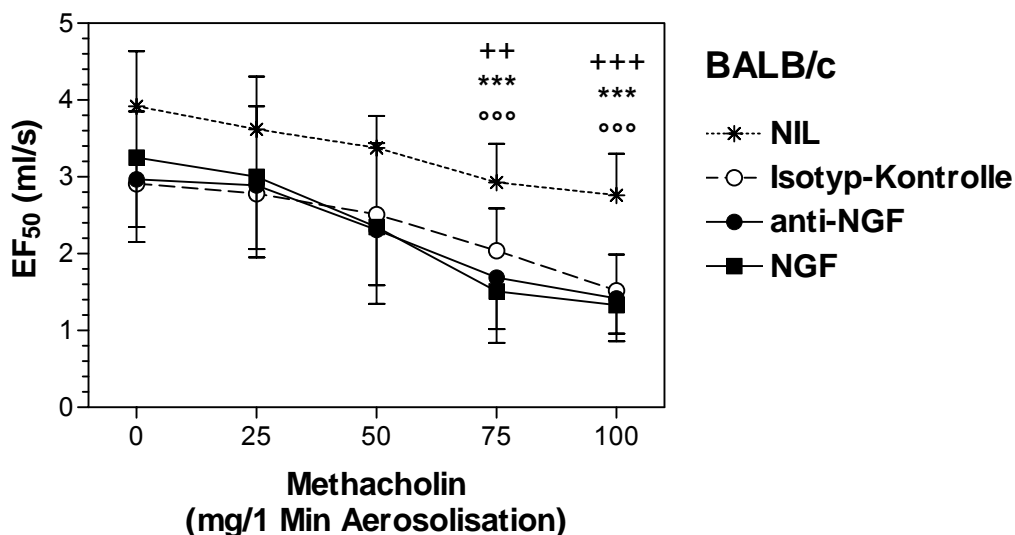


Abbildung 13: Atemwegsreaktivität bei BALB/c-Mäusen, gemessen an der Reaktion auf Inhalation von Methacholin mittels *Head-out* Bodyplethysmographie an Tag 29 nach Protokoll 2. Die Kurven stellen Mittelwerte \pm SD dar. Isotyp-Kontrolle, anti-NGF- und NGF-Gruppen zeigen verglichen miteinander keine statistisch relevanten Unterschiede. NIL: n = 4; Isotyp-Kontrolle: n = 21; anti-NGF: n = 22; NGF: n = 20. NIL versus Isotyp-Kontrolle: ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$. NIL versus anti-NGF: *** $p < 0,001$. NIL versus NGF: °°° $p < 0,001$.

IV.6 Erhöhte Sensorische Reagibilität der Atemwege in CCSP-NGF-*tg*-Mäusen

Die sensorische Hyperreagibilität ist gekennzeichnet durch eine gesteigerte Erregbarkeit sensorischer Neurone auf unspezifische Stimuli (Alarie, 1998). Ausgelöst werden kann eine solche gesteigerte Erregung der Neurone in den Atemwegen durch Inhalation von Capsaicin. Dieses wirkt über Vanilloid-Rezeptoren, die überwiegend von sensorischen Neuronen exprimiert werden, und bewirkt dort die Sekretion von Tachykininen wie Substanz P (SP).

Charakteristisch für die sensorische Hyperreagibilität ist außerdem eine Verlängerung der Atempause vor der Expiration (Time of break, T_B). Diese wurde in einer Bodyplethysmographiemessung 24 Stunden nach der letzten aerosolischen Allergen-Provokation bei sensibilisierten CCSP-NGF-*wt* und NGF-*tg* gemessen (Protokoll 2). Während der Messung wurde in steigender Konzentration Capsaicin jeweils für eine Minute in die Apparatur vernebelt. Dies hatte einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Parameters T_B zur Folge, d.h. je höher die Capsaicinkonzentration, desto länger war die präexpiratorische Atempause (T_B). Es zeigte sich, dass dieser Effekt bei den transgenen Tieren schon vor der ersten Capsaicingabe und im weiteren Verlauf bei jeder Capsaicinkonzentration gegenüber den *wt*-Tieren massiv erhöht war (Abb. 14). Zu erkennen ist außerdem, dass bei beiden Gruppen ab einer bestimmten Capsaicinkonzentration eine Sättigung erreicht ist, der T_B also nicht weiter steigt.

Um zu kontrollieren, dass dieser Effekt in dem vorliegenden Tiermodell nicht auf eine direkte Wirkung des Capsaicin auf die glatten Muskelzellen zurückzuführen, sondern allein ein neuronaler Prozess ist, wurde gleichzeitig zusätzlich der EF_{50} -Wert, ein Parameter für die Muskelkontraktion, unter Capsaicingabe gemessen. Wie erwartet zeigte sich, dass die Gabe von Capsaicin in jeglicher Konzentration keinerlei Effekt auf den EF_{50} zur Folge hatte, weder bei den Wildtypen, noch bei ihren transgenen Artgenossen, und diese auch untereinander in ihrem EF_{50} kaum Unterschiede aufwiesen.

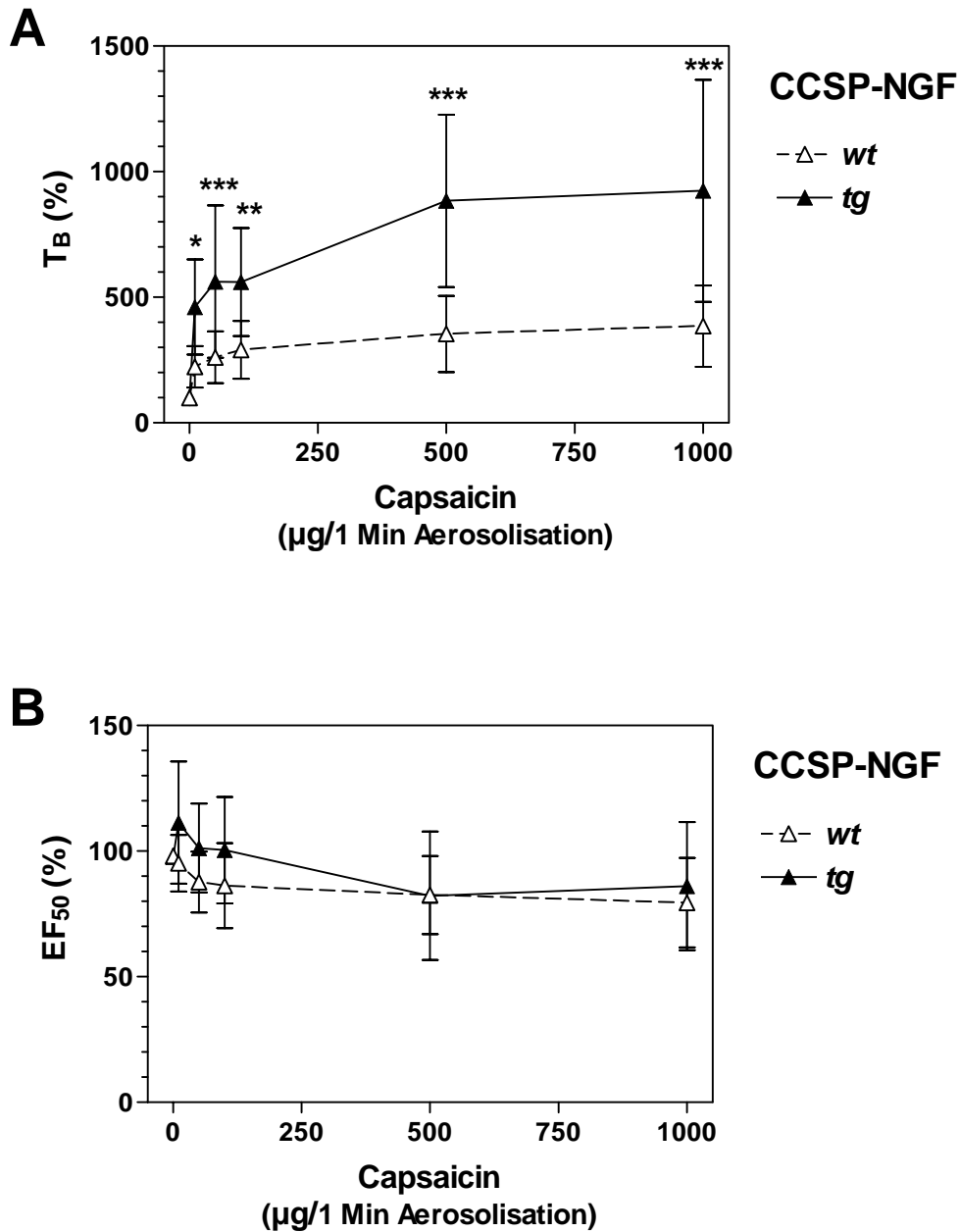


Abbildung 14: Sensorische Reagibilität (A) und Atemflusseinschränkung (B) bei sensibilisierten CCSP-NGF-*wt*- und CCSP-NGF-*tg*-Mäusen, gemessen an Tag 29 mittels *Head-out* Bodyplethysmographie an der Reaktion auf Inhalation von Capsaicin nach Protokoll 2. Die Kurven stellen Mittelwerte +/- SD in Prozent Ausgangslinie. CCSP-NGF-*wt* und CCSP-NGF-*tg*: n = 24; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

V DISKUSSION

Die *in vivo* in einem etablierten murinen Tiermodell zur Atemwegsentzündung erhobenen experimentellen Daten der vorliegenden Arbeit belegen einen signifikant potenzierenden Einfluss von NGF auf die drei bedeutendsten pathogenen Komponenten des allergischen Asthma bronchiale: die allergische Atemwegsentzündung, die pulmonale allergische Frühphasereaktion und die neuronale Atemwegshyperreagibilität.

Während in dem verwendeten Modell mit BALB/c-Mäusen die pulmonale allergische Frühphasereaktion durch die Behandlung mit blockierenden Antikörpern gegen NGF verkürzt und abgeschwächt werden konnte, war sie bei CCSP-*tg*-Mäusen mit chronischer lokaler Überexpression von NGF in der Lunge im Gegensatz zu CCSP-*wt*-Mäusen verlängert und verstärkt. Außerdem scheint NGF ein Verstärker der allergischen Atemwegsentzündung zu sein, indem sowohl die Rekrutierung von Eosinophilen und Lymphozyten in die Lunge als auch die lokale Produktion der proinflammatorischen Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 nach Allergenprovokation durch NGF erheblich verstärkt wird. Weitere Untersuchungen ergaben, dass weder eine Behandlung mit anti-NGF noch mit NGF die Methacholin-induzierte Hyperreaktivität der Atemwege veränderte, wohl aber die sensorische Hyperreagibilität auf Inhalation des nicht-allergischen neuronalen Reizmittels Capsaicin durch die konstitutive Überexpression von NGF in der Lunge stimuliert werden konnte.

Die allergische Frühphasereaktion steht in direkter Beziehung zu der Mediatorfreisetzung aus Mastzellen. NGF vermittelt seine biologische Aktivität durch Bindung an zwei distinkte Rezeptoren auf der Zelloberfläche, den niedrigaffinen Rezeptor p75^{NTR} und den hochaffinen Rezeptor trkA. p75^{NTR} bindet alle Neurotrophine, während trkA spezifisch an NGF bindet (Barbacid, 1994, Chao & Hempstead, 1995). Beide Rezeptoren werden von Mastzellen exprimiert. IL-3-stimulierte Mastzellen der Maus exprimieren mRNA sowohl für trkA als auch für p75^{NTR} (Jippo et al., 1994), wohingegen Mastzellen von Ratten nur funktionelle trkA-Rezeptoren, jedoch keine p75^{NTR} exprimieren

(Horigome et al., 1993, Kawamoto et al., 1995). Menschliche Mastzellen, einschließlich immaturer Mastzellen der humanen Mastzelllinie HMC-1 sowie umbilikaler und Lungenmastzellen exprimieren ebenfalls funktionelle trkA-Rezeptoren (Kassel et al., 2001, Nilsson et al., 1997, Tam et al., 1997).

NGF beeinflusst die Mastzelle auch hinsichtlich ihrer Entwicklung und Funktion. So bewirkt eine subkutane Injektion von NGF bei neugeborenen Ratten eine Hyperplasie und Hypertrophie der Mastzellen in verschiedenen Organen (Aloe, 1988, Aloe & Levi-Montalcini, 1977, Levi-Montalcini et al., 1996). Eine Studie berichtet, dass bei Asthmapatienten eine niedrigdosierte Allergeninhalation zu einer Erhöhung sowohl der NGF-mRNA-Produktion als auch der Zahl der Mastzellen in den Atemwegen führt (Kassel et al., 2001). Umgekehrt konnte die Zahl der Mastzellen in Ratten mit Hilfe von Antikörpern gegen NGF massiv reduziert werden (Aloe, 1988). *In Vitro* beschleunigt NGF in Gegenwart von IL-3 die Reifung von Mastzellen aus dem Knochenmark von Ratten (Matsuda et al., 1991). Weiterhin verlängert NGF durch Hemmung von Apoptose das Überleben von peritonealen Mastzellen aus Ratten (Horigome et al., 1994, Kawamoto et al., 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mastzellen von Mensch, Maus und Ratte sowie HMC-1-Zellen selbst NGF produzieren. (Leon et al., 1994, Nilsson et al., 1997, Tam et al., 1997, Xiang & Nilsson, 2000). NGF wirkt chemotaktisch auf peritoneale Mastzellen aus Ratten (Sawada et al., 2000) und kann die Degranulation bzw. die Freisetzung von Mediatoren aus diesen Zellen induzieren (Bruni et al., 1982, Marshall et al., 1990, Pearce & Thompson, 1986).

Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass eine konstitutive Überproduktion von NGF in OVA-sensibilisierten CCSP-NGF-*tg*-Mäusen die Serotoninausschüttung in der Lunge als Antwort auf Allergenprovokation erhöht (Path et al., 2002). Neben der chemotaktischen Anlockung von Mastzellen ist allerdings auch denkbar, dass NGF die Serotoninausschüttung bereits vorhandener Mastzellen zu erhöhen vermag.

Der Kontakt von Mastzellen der Maus mit IgE resultiert in einer Hochregulation der hochaffinen FcεRI-Expression, wodurch es in Folge zur verstärkten

Freisetzung von Serotonin, IL-6 und IL-4 kommt (Yamaguchi et al., 1997). IgE stimuliert weiterhin die Sekretion von NGF aus kultivierten Knochenmarks-Mastzellen (Xiang & Nilsson, 2000). Folglich scheint die Erhöhung der IgE-Spiegel ein Mechanismus zu sein, der die Effektor-Funktionen der Mastzellen zu steigern vermag. Vieles weist darauf hin, dass NGF in diesen Prozessen eine wichtige Rolle spielen könnte: So ist NGF in der Lage, die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Immunglobulin-sezernierenden Plasmazellen zu induzieren (Brodie & Gelfand, 1994, Kimata et al., 1991a, Kimata et al., 1991b). Auch konnte beim Menschen ein direkter Zusammenhang zwischen Gesamt-IgE-Titer, der Schwere der Asthmaerkrankung und dem NGF-Serumspiegel beobachtet werden (Bonini et al., 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten jedoch keine Unterschiede in den Konzentrationen von Serum-IgE zwischen den NGF-*tg*-Tieren und der korrespondierenden Kontrollgruppe nachweisen. Es scheint daher unwahrscheinlich zu sein, dass die NGF-induzierte Verstärkung der allergischen Frühphasereaktion über eine modulierte Produktion von IgE-Antikörpern vermittelt wird.

Die Wirkung von NGF auf die Neurone beruht primär auf der Aktivierung des hochaffinen *trkA*-Rezeptors, welcher auf sympathischen und einer Untergruppe von sensorischen Neuronen exprimiert wird (Martin-Zanca et al., 1990, Smeyne et al., 1994). An erregbaren Neuronen fördert NGF deren Wachstum und Überleben, wirkt chemotaktisch auf im Wachstum befindliche Axone (Hoyle et al., 1993, Levi-Montalcini, 1987) und induziert lokale Hyperinnervation in transgenen Mäusen mit einer NGF-Überproduktion unter der Kontrolle von gewebsspezifischen Promotoren (Edwards et al., 1989, Hoyle et al., 1998, Hoyle et al., 1993). Kultivierte embryonale *trkA*-exprimierende Trigemini-neurone zeigten in Anwesenheit von NGF ein stärkeres Wachstum als ohne NGF-Zugabe (Ulupinar et al., 2004). Darüber hinaus erhöht NGF in sensorischen Neuronen die Produktion von SP (Donnerer et al., 1992, Hunter et al., 2000, Lindsay & Harmar, 1989, Vedder et al., 1993). Die beträchtlich erhöhten SP-Spiegel in der BALF von NGF-*tg*-Mäusen mit Lungen-spezifischer NGF-Überproduktion zeigen, dass NGF ebenfalls die Sekretion von SP erhöht (Hoyle et al., 1998). SP wird von

sensorischen Neuronen gebildet (Nawa et al., 1984). Hinsichtlich der Wirkung von NGF auf die neuronale Sekretion und Freisetzung von SP kommt neben dem hochaffinen trkA-Rezeptor dem niedrigaffinen p75^{NTR}-Rezeptor immer mehr Bedeutung zu. Zunehmend wird auch eine Interaktion zwischen beiden Rezeptoren diskutiert, was eine Verstärkung der Signaltransduktion zur Folge hat (Colquhoun et al., 2004, Epa et al., 2004). Untersuchungen an p75^{NTR}-*knock-out*-Mäusen zeigten, dass die sensorische Hyperreagibilität auf Capsaicin bei diesen Tieren gänzlich ausblieb, und auch bei wildtyp-Mäusen durch blockierende Antikörper gegen den p75^{NTR}-Rezeptor verhindert werden konnte (Kerzel et al., 2003). Außerdem zeigte eine weitere Studie, dass der SP-Gehalt in p75^{NTR}-*knock-out*-Mäusen um ~50% verringert war (Graham et al., 2001). SP ist im Stande, die bronchopulmonale Ansprechbarkeit auf sensorische Reflexe zu verstärken (Mutoh et al., 2000). Die Freisetzung von SP kann durch eine Vielzahl von mechanischen, thermischen, chemischen (z.B. Capsaicin) und inflammatorischen Stimuli induziert werden (Barnes, 1996). Einmal freigesetzt, besitzt SP einen breiten proinflammatorischen Wirkungsbereich, einschließlich Mastzellchemotaxis und -degranulation als auch einer Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen (Joos et al., 2000). Die beobachtete Verringerung des Eosinophileninflux und der lokalen IL-4- und IL-5-Produktion in mit anti-NGF behandelten Mäusen, und umgekehrt die Steigerung der Rekrutierung von Eosinophilen und Lymphozyten in die Lunge bei NGF-*tg*-Mäusen könnte daher in Beziehung stehen mit der NGF-induzierten Steigerung der Produktion und Freisetzung von SP. Weiterhin konnte eine Wirkung von NGF auf Eosinophile *in vivo* in Lungen von Asthmapatienten bestätigt werden, in denen die Lungeneosinophilen eine stark erhöhte Expression sämtlicher Neurotrophinrezeptoren zeigten (Nassenstein et al., 2003). Umgekehrt wurde die Produktion, Speicherung und Sekretion von NGF aus Eosinophilen bei Asthmatikern erst kürzlich demonstriert (Noga et al., 2003). Auch Lymphozyten und Makrophagen konnten als zusätzliche Quellen für NGF in entzündeten Lungen identifiziert werden (Lommatzsch et al., 2003). Da die asthmatische Spätphasereaktion hauptsächlich durch Eosinophile und Lymphozyten vermittelt wird (Bousquet et al., 2000), könnte NGF daher auch für die Entwicklung der allergischen Spätphasereaktion von Bedeutung sein.

Zusätzlich zu diesem proinflammatorischen Wirkungsbereich gibt es auch Beweise für eine gewisse antiinflammatorische Wirkung von NGF. So wurde eine durch NGF verursachte Hemmung der transendothelialen Monozytenmigration in einem experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis-Modell beobachtet (Flugel et al., 2001), sowie eine Reduktion der CGRP-Genexpression in aktivierten B-Zellen (Bracci-Laudiero et al., 2002). Außerdem wird in der Literatur über eine Rolle des NGF bei der Wundheilung berichtet. Dieser Effekt des NGF scheint vor allem via Induktion der Keratinozyten- (Pincelli, 2000) und Endothelzell-Proliferation (Raychaudhuri et al., 2001) sowie der Fibroblastenmigration und -differenzierung (Micera et al., 2001) vermittelt zu werden. In diesem Sinne soll NGF auch im Tumorwachstum involviert sein (Descamps et al., 1998, Oelmann et al., 1995, Zhu et al., 2001).

In unterschiedlichen Geweben sind Mastzellen in unmittelbarer Nähe zu Neuronen lokalisiert (Laine et al., 2000, Liang et al., 1998, McKay & Bienenstock, 1994, Rozniecki et al., 1999, Stead et al., 1987). SP, von Neuronen sezerniert, aktiviert in diesem Zusammenhang die Mastzelle über seinen hochaffinen Neurokinin (NK)-1-Rezeptor (Suzuki et al., 1999). Wird der NK-1-Rezeptor mit Hilfe des Antagonisten RP67580 blockiert, so bleibt die tracheale Hyperreagibilität in allergisierten Mäusen vollständig aus (Scheerens et al., 1996).

Die in dieser Arbeit untersuchten CCSP-NGF-*tg*-Mäuse aller Versuchsgruppen zeigten eine verstärkte Frühphasereaktion gegenüber den korrespondierenden CCSP-NGF-*wt*-Gruppen. Dieser Effekt wurde begleitet von einer wesentlichen Zunahme der Reagibilität sensorischer Neurone der Lunge in den CCSP-NGF-*tg* Mäusen als Antwort auf die Inhalation von Capsaicin. Weiterhin sind die SP-Spiegel in diesen Tieren beträchtlich erhöht (Hoyle et al., 1998). Dies könnte darauf hinweisen, dass die durch Reizmittel induzierte sensorische Hyperreagibilität die Freisetzung von SP erhöht und in Folge auch die lokalen Mastzellen aktiviert werden.

Obwohl SP in höheren Dosen auch direkt eine Mastzelldegranulation bewirken kann (Shanahan et al., 1985) und Vanilloidrezeptoren für Capsaicin auch auf murinen Mastzellen zu finden sind (Biro et al., 1998), konnte keine Einschränkung des Atemflusses (EF_{50}) als Reaktion auf eine Capsaicin-induzierte sensorische Hyperreagibilität festgestellt werden.

Vanilloidrezeptoren werden in gewissem Maße auch von einigen nicht-neuronalen Zellen exprimiert; etwa den Epithelzellen der Atemwege, serösen Drüsenzellen der Submukosa sowie mononukleären Zellen (Delany et al., 2001, Veronesi et al., 1999). Da der Parameter T_B , welcher die endexpiratorische Atempause beschreibt, nach Inhalation von Capsaicin unmittelbar anstieg, aber der Wert EF_{50} als Maß für die Kontraktion glatter Muskelzellen in den Atemwegen keiner Veränderung unterlag, lässt sich schlussfolgern, dass die erhöhte Empfindlichkeit der CCSP-NGF-*tg*-Tiere gegenüber Capsaicin eher auf der bei diesen Mäusen beobachteten sensorischen Hyperreagibilität beruht (Hoyle et al., 1998, Kerzel et al., 2003), und nicht auf der indirekten Wirkung von sezernierten Faktoren nicht-neuronaler Zellen. Aus diesem Grund scheint eine direkte oder SP-vermittelte Capsaicin-induzierte Mastzellaktivierung in diesem *in vivo*-Modell nicht von Relevanz zu sein. Weiterhin zeigte weder die Behandlung mit NGF noch mit anti-NGF eine Wirkung auf die Metacholin-induzierte Atemwegshyperreaktivität (EF_{50}). Dies zeigt, dass NGF keinen Effekt auf die Empfindlichkeit glatter Muskelzellen in den Atemwegen gegenüber unspezifischen Reizen hat.

SP ist in der Lage, in geringer Dosis die Schwelle für eine Mastzellaktivierung durch andere Stimuli herabzusetzen (Janiszewski et al., 1994). Dieser stimulierende Effekt des von sensorischen Neuronen freigesetzten SP auf Mastzellen könnte einen zusätzlichen Mechanismus der Verstärkung der allergischen Frühphasereaktion darstellen und als Bindeglied zwischen Allergen-unabhängiger Atemwegshyperreagibilität und Allergen-abhängiger Asthmareaktion fungieren.

Die meisten der hier diskutierten Mechanismen, wie NGF die Allergen-induzierte Frühphasereaktion zu verstärken vermag, beruhen auf dem

Paradigma, dass IgE-aktivierte Mastzellen die prinzipiellen Auslöser einer allergischen Frühphasereaktion sind und dass eine erhöhte Serotonin-freisetzung in CCSP-NGF-*tg*-Mäusen nachweisbar ist. In der Maus wurde die zentrale Rolle der Mastzellen bei der Atemwegsentzündung und AHR mehrfach bestätigt (Kobayashi et al., 2000, Williams & Galli, 2000). Auf der anderen Seite konnte eine Studie erst kürzlich zeigen, dass auch in Mastzell-defizienten Mäusen eine allergische Frühphasereaktion ausgelöst werden kann (Crosby et al., 2002). Es scheint also außer der Mastzelle noch andere zelluläre Mechanismen zu geben, die zu einer Frühphasereaktion führen können. Die gegensätzlichen Beobachtungen können natürlich auch auf Unterschieden zwischen den verwendeten Mausstämmen oder Asthma-modellen beruhen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass NGF die allergische Frühphasereaktion in jedem Fall auch über eine erhöhte Freisetzung von Mastzellmediatoren zu verstärken vermag. Dieser Aspekt wird erheblich unterstützt durch die Arbeit von *de Vries et al., 2002* (De Vries et al., 2002), in welcher durch Antikörper gegen NGF eine Reduktion der Allergen-induzierten Bronchokonstriktion in Meerschweinchen demonstriert werden konnte. Auch in sensibilisierten Ratten konnte eine Behandlung mit anti-NGF die allergische Frühphasereaktion verringern (Glaab et al., 2003). Weiterhin verstärkt NGF während der akuten allergischen Atemwegsentzündung die lokale Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 sowie die Einwanderung von Eosinophilen und Lymphozyten in das entzündete Gewebe. Darüber hinaus bewirken chronisch erhöhte NGF-Spiegel in der Lunge eine Hyperreagibilität der sensorischen Neurone.

Im hier verwendeten murinen Asthmodell erscheint NGF als zentraler Mediator der Interaktion zwischen Immun- und Nervensystem in der Pathogenese der akuten und chronischen allergischen Atemwegsentzündung.

V.1 Schlussfolgerung

NGF verstärkt die wichtigsten pathogenen Parameter in dem hier verwendeten murinen Modell des humanen Asthma bronchiale (Übersicht in Abb. 15).

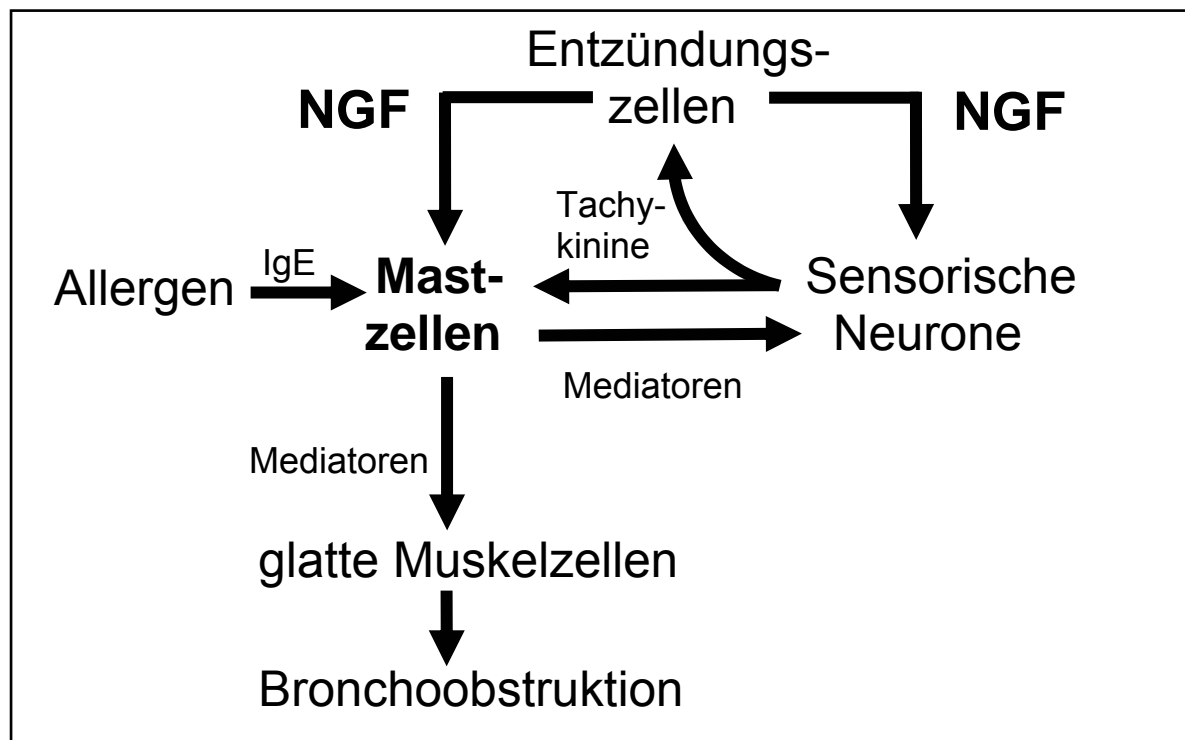


Abbildung 15: Hypothetischer Mechanismus der NGF-vermittelten Verstärkung der Allergen-induzierten Frühphasereaktion

Durch die der chronischen Inflammation zugrunde liegende Einwanderung einer Vielzahl von Entzündungszellen in die Atemwege wird dort vermehrt NGF gebildet. NGF wiederum verstärkt seinerseits die lokale allergische Inflammation der Lunge, indem es Entzündungszellen aktiviert und weiter deren Einwanderung in die Atemwege bewirkt. Außerdem wirkt NGF auf die IgE-aktivierten Mastzellen, indem es diese zur Degranulation ebenfalls proinflammatorisch wirkender Mediatoren wie Histamin, Leukotriene etc. anregt. An sensorischen Neuronen in den Atemwegen bewirkt NGF eine erhöhte Produktion von Tachykininen, insbesondere von SP. SP wirkt wiederum aktivierend auf die lokale Inflammation. Ebenfalls vermag SP die Schwelle für eine Mastzellaktivierung durch andere Stimuli herabzusetzen. Die

durch NGF induzierte Erhöhung der Tachykininproduktion bewirkt die neuronale Hyperreagibilität der Atemwege, d.h. es bedarf einer geringeren Reizstärke, um eine größere Menge an Tachykininen freizusetzen. Die Neurone sind hyperreagibel auf eine Vielzahl unspezifischer Stimuli. Sowohl die Mastzellmediatoren wie Histamin beim Menschen und Serotonin bei der Maus, als auch die von Neuronen sezernierten Tachykinine wie SP bewirken eine Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege und können so die allergische Frühphasereaktion auslösen. Dazu braucht es, bedingt durch die neuronale Hyperreagibilität, nicht mehr zwingend des Allergens, es reichen auch unspezifische Reize wie körperliche Anstrengung, trockene oder kalte Luftverhältnisse, um eine Bronchoobstruktion und letztendlich das Vollbild des Asthma bronchiale hervorzurufen.

VI ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenhang zwischen verschiedenen Komponenten in der Pathogenese des Asthma bronchiale	S.12
Abbildung 2: Wirkung des NGF auf verschiedene Zellen des Immunsystems	S.14
Abbildung 3: Ausschnitt aus einem ethidiumbromidhaltigen Agarose- Gel	S.20
Abbildung 4: Experimentelles Design	S.22
Abbildung 5: Bodyplethysmographie	S.27
Abbildung 6 A: Normale Atmungsmuster	S.28
Abbildung 6 B: Sensorische Irritation der oberen Atemwege nach Stimulation mit Chlorobenzylchlorid	S.28
Abbildung 6 C: Atemflusseinschränkung nach Stimulation mit Methacholin	S.29
Abbildung 7: Allergische Frühphasereaktion in BALB/c-Mäusen	S.38
Abbildung 8: Allergische Frühphasereaktion in CCSP-NGF-Mäusen	S.39
Abbildung 9 A-D: Differenzierung und Zahl von Zellen aus BALF	S.42
Abbildung 10 A-C: Zytokinspiegel in BALF	S.43
Abbildung 11: Spiegel von Gesamt (A)- und OVA-spezifischem IgE (B) in Serumproben	S.45
Abbildung 12: Serotoninspiegel in BALF	S.46
Abbildung 13: Atemwegsreaktivität bei BALB/c-Mäusen	S.47
Abbildung 14: Sensorische Reagibilität (A) und Atemflusseinschränkung (B) bei sensibilisierten CCSP-NGF- <i>wt</i> - und CCSP-NGF- <i>tg</i> -Mäusen	S.49
Abbildung 15: Hypothetischer Mechanismus der NGF-vermittelten Verstärkung der Allergen-induzierten Frühphasereaktion	S.57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1+2: Versuchsgruppen und Behandlungssubstanzen für
Sensibilisierung, Vorbehandlung und Provokation
in Protokoll 1 bzw. 2

S.23, 24

VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb	Abbildung
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
Anti-NGF	NGF-Antiserum
APC	<i>Antigen presenting cells</i> , Antigen präsentierende Zelle
AU	<i>Arbitrary Units</i> , willkürliche Einheiten
BALB/c	Mausstamm (weiss)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BDNF	Brain derived Neurotrophic Factor
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
B-Zelle	B-Lymphozyt
CCSP	<i>Clara cell specific secretory protein</i> , Clarazellen spezifisches Sekretorisches Protein
C57Bl/6	Mausstamm (schwarz)
CD	Cluster of designation, Ordnungssystem für Zellen anhand von Oberflächenrezeptoren
C-Fasern	sensible Nervenfasern
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
DL	Detektionslimit
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleid acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EF ₅₀	Expiratorischer Atemfluss bei 50% Tidalvolumen
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
Eos	Eosinophile
Exp	Expiration
Fc-ε-Rezeptoren	Immunglobulin bindender Rezeptor
FK224	Antagonist am Neurokininrezeptor
Ges	Gesamt

HMC	Humane Mastzelllinie
IFN- γ	Interferon- γ
IgE, G1, G2a, G4	Immunglobulin E, G1, G2a, G4
IL	Interleukin
i.m.	Intramuskulär
i.n.	Intranasal
Insp	Inspiration
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
KD	Kilo Dalton
Lym	Lymphozyten
M	Molar
Mch	Methacholin
MHC	Major Histocompatibility Complex
mM	Mikromolar
m-RNA	<i>Messenger-Ribonucleid acid</i>
MW	Mittelwert
M ϕ	Makrophagen
Neu	Neutrophile
NGF	Nerve growth Faktor, Nervenwachstumsfaktor
NGF- <i>wt</i>	NGF wildtyp
NGF- <i>tg</i>	NGF transgen
NIL	unbehandelte Tiergruppe
NK	Neurokinin
NT	Neurotrophin
OVA	Ovalbumin, Allergen aus dem Eiweiss
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
p75 ^{NTR}	P75- Neurotrophinrezeptor, niedrig affiner NGF Rezeptor
RNA	<i>Ribonucleid acid</i> , Ribonukleinsäure
RP 67580	Antagonist am NK-1-Rezeptor
RT	Raumtemperatur

SD	Standardabweichung
SJL	Mausstamm
SP	Substanz P
T _B	<i>Time of break</i> , Atempause vor Expiration
T _P	<i>Time of pause</i> , Atempause nach Expiration
Th 1, 2	T Helferzellpopulation 1 bzw. 2
Tg	Transgen
TMB	Tetramethylbenzidin
trk	Tyrosinkinase-Rezeptor, bindet Neurotrophine
T-Zelle	T-Lymphozyt
VT	Tidalvolumen (Atemzugvolumen)
VTE	Expiratorisches Tidalvolumen
w	weiblich
Wt	Wildtyp

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Alarie, Y. (1998) Computer-based bioassay for evaluation of sensory irritation of airborne chemicals and its limit of detection, *Arch Toxicol*, 72(5), pp. 277-282.
- Aloe, L. (1988) The effect of nerve growth factor and its antibody on mast cells in vivo, *J Neuroimmunol*, 18(1), pp. 1-12.
- Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. (1977) Mast cells increase in tissues of neonatal rats injected with the nerve growth factor, *Brain Res*, 133(2), pp. 358-366.
- Barbacid, M. (1994) The Trk family of neurotrophin receptors, *J Neurobiol*, 25(11), pp. 1386-1403.
- Barnes, P.J. (1995) Overview of neural mechanisms in asthma, *Pulm Pharmacol*, 8(4-5), pp. 151-159.
- Barnes, P.J. (1996) Neuroeffector mechanisms: The interface between inflammation and neuronal responses, *J Allergy Clin Immunol*, 98(5 Pt 2), pp. S73-81; discussion S81-73.
- Baumgarten, C.R., Witzel, A., Kleine-Tebbe, J. & Kunkel, G. (1996) Substance P enhances antigen-evoked mediator release from human nasal mucosa, *Peptides*, 17(1), pp. 25-30.
- Biro, T., Maurer, M., Modarres, S., Lewin, N.E., Brodie, C., Acs, G., Acs, P., Paus, R. & Blumberg, P.M. (1998) Characterization of functional vanilloid receptors expressed by mast cells, *Blood*, 91(4), pp. 1332-1340.
- Blyth, D.I., Pedrick, M.S., Savage, T.J., Bright, H., Beesley, J.E. & Sanjar, S. (1998) Induction, duration, and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma: effect of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19(1), pp. 38-54.
- Bonini, S., Lambiase, A., Angelucci, F., Magrini, L., Manni, L. & Aloe, L. (1996) Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20), pp. 10955-10960.
- Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Lommatzsch, M., Peters, E.M., Lewin, G.R., Subramaniam, A., Braun, A., Renz, H. & Paus, R. (1998) BDNF

- overexpression induces differential increases among subsets of sympathetic innervation in murine back skin, *Eur J Neurosci*, 10(10), pp. 3276-3283.
- Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M. & Vignola, A.M. (2000) Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling, *Am J Respir Crit Care Med*, 161(5), pp. 1720-1745.
- Bracci-Laudiero, L., Aloe, L., Buanne, P., Finn, A., Stenfors, C., Vigneti, E., Theodorsson, E. & Lundberg, T. (2002) NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF?, *J Neuroimmunol*, 123(1-2), pp. 58-65.
- Bradding, P., Roberts, J.A., Britten, K.M., Montefort, S., Djukanovic, R., Mueller, R., Heusser, C.H., Howarth, P.H. & Holgate, S.T. (1994) Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor-alpha in normal and asthmatic airways: Evidence for the human mast cell as a source of these cytokines, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10(5), pp. 471-480.
- Braun, A., Appel, E., Baruch, R., Herz, U., Botchkarev, V., Paus, R., Brodie, C. & Renz, H. (1998) Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma, *Eur J Immunol*, 28(10), pp. 3240-3251.
- Braun, A. & Renz, H. (2001) [Role of neurotrophins in the pathogenesis of allergic bronchial asthma], *Internist (Berl)*, 42(8), pp. 1086-1095.
- Brodie, C. & Gelfand, E.W. (1994) Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor: Comparison with anti-CD40, *J Neuroimmunol*, 52(1), pp. 87-96.
- Bruni, A., Bigon, E., Boarato, E., Miletto, L., Leon, A. & Toffano, G. (1982) Interaction between nerve growth factor and lysophosphatidylserine on rat peritoneal mast cells, *FEBS Lett*, 138(2), pp. 190-192.
- Busse, W.W. & Lemanske, R.F., Jr. (2001) Asthma, *N Engl J Med*, 344(5), pp. 350-362.
- Chao, M.V. & Hempstead, B.L. (1995) p75 and Trk: A two-receptor system, *Trends Neurosci*, 18(7), pp. 321-326.
- Cheung, D., van der Veen, H., den Hartigh, J., Dijkman, J.H. & Sterk, P.J. (1994) Effects of inhaled substance P on airway responsiveness to

- methacholine in asthmatic subjects in vivo, *J Appl Physiol*, 77(3), pp. 1325-1332.
- Cieslewicz, G., Tomkinson, A., Adler, A., Duez, C., Schwarze, J., Takeda, K., Larson, K.A., Lee, J.J., Irvin, C.G. & Gelfand, E.W. (1999) The late, but not early, asthmatic response is dependent on IL-5 and correlates with eosinophil infiltration, *J Clin Invest*, 104(3), pp. 301-308.
- Clay, M.M. (1983) Evaluating jet nebulisers, *Lancet*, 2(8362), pp. 1305.
- Cockcroft, D.W., Ruffin, R.E., Dolovich, J. & Hargreave, F.E. (1977) Allergen-induced increase in non-allergic bronchial reactivity, *Clin Allergy*, 7(6), pp. 503-513.
- Colquhoun, A., Lawrance, G., Shamovsky, I., Riopelle, R. & Ross, G. (2004) Differential activity of the NGF antagonist PD90780 suggests altered NGF-p75NTR interactions in the presence of TrkA, *J Pharmacol Exp Ther*, 29, pp. 29.
- Crosby, J.R., Cieslewicz, G., Borchers, M., Hines, E., Carrigan, P., Lee, J.J. & Lee, N.A. (2002) Early phase bronchoconstriction in the mouse requires allergen-specific IgG, *J Immunol*, 168(8), pp. 4050-4054.
- De Vries, A., Dessing, M.C., Engels, F., Henricks, P.A. & Nijkamp, F.P. (1999) Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor-mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs, *Am J Respir Crit Care Med*, 159(5 Pt 1), pp. 1541-1544.
- De Vries, A., Engels, F., Henricks, P.A., Leusink-Muis, T., Fischer, A. & Nijkamp, F.P. (2002) Antibodies directed against nerve growth factor inhibit the acute bronchoconstriction due to allergen challenge in guinea-pigs, *Clin Exp Allergy*, 32(2), pp. 325-328.
- Delany, N.S., Hurle, M., Facer, P., Alnadaf, T., Plumpton, C., Kinghorn, I., See, C.G., Costigan, M., Anand, P., Woolf, C.J., Crowther, D., Sanseau, P. & Tate, S.N. (2001) Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2, *Physiol Genomics*, 4(3), pp. 165-174.
- Descamps, S., Lebourhis, X., Delehedde, M., Boilly, B. & Hondermarck, H. (1998) Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells, *J Biol Chem*, 273(27), pp. 16659-16662.

- Donnerer, J., Schuligoi, R. & Stein, C. (1992) Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo, *Neuroscience*, 49(3), pp. 693-698.
- Durham, S.R. (1991) The significance of late responses in asthma, *Clin Exp Allergy*, 21(1), pp. 3-7.
- Edwards, R.H., Rutter, W.J. & Hanahan, D. (1989) Directed expression of NGF to pancreatic beta cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets, *Cell*, 58(1), pp. 161-170.
- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U. & Otten, U. (1993) Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), pp. 10984-10988.
- Ehrhard, P.B., Erb, P., Graumann, U., Schmutz, B. & Otten, U. (1994) Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation, *J Immunol*, 152(6), pp. 2705-2709.
- Epa, W.R., Markovska, K. & Barrett, G.L. (2004) The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation, *J Neurochem*, 89(2), pp. 344-353.
- Finotto, S., De Sanctis, G.T., Lehr, H.A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P.R., Renz, H. & Neurath, M.F. (2001) Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression, *J Exp Med*, 193(11), pp. 1247-1260.
- Flugel, A., Matsumuro, K., Neumann, H., Klinkert, W.E., Birnbacher, R., Lassmann, H., Otten, U. & Wekerle, H. (2001) Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration, *Eur J Immunol*, 31(1), pp. 11-22.
- Fox, A.J., Patel, H.J., Barnes, P.J. & Belvisi, M.G. (2001) Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases, *Eur J Pharmacol*, 424(2), pp. 159-162.
- Friberg, S.G., Olgart Hoglund, C. & Gustafsson, L.E. (2001) Nerve growth factor increases airway responses and decreases levels of exhaled nitric

- oxide during histamine challenge in an in vivo guinea-pig model, *Acta Physiol Scand*, 173(2), pp. 239-245.
- Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Esteban, I., Martinez del Valle, M., Naves, F.J. & Vega, J.A. (1997) Neurotrophin receptor-like protein immunoreactivity in human lymph nodes, *Anat Rec*, 249(2), pp. 226-232.
- Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Esteban, I., Sainz, R., Naves, F.J. & Vega, J.A. (1998) Expression of the TrkB neurotrophin receptor by thymic macrophages, *Immunology*, 94(2), pp. 235-241.
- Germonpre, P.R., Joos, G.F. & Pauwels, R.A. (1998) Modulation by 5-HT_{1A} receptors of the 5-HT₂ receptor-mediated tachykinin-induced contraction of the rat trachea in vitro, *Br J Pharmacol*, 123(8), pp. 1571-1578.
- Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Neuhaus-Steinmetz, U., Fabel, H., Alarie, Y. & Renz, H. (2001) Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280(3), pp. L565-573.
- Glaab, T., Hoymann, H.G., Hecht, M., Korolewitz, R., Tschernig, T., Hohlfeld, J.M., Krug, N. & Braun, A. (2003) Effect of anti-nerve growth factor on early and late airway responses in allergic rats, *Allergy*, 58(9), pp. 900-904.
- Graham, R.M., Friedman, M. & Hoyle, G.W. (2001) Sensory nerves promote ozone-induced lung inflammation in mice, *Am J Respir Crit Care Med*, 164(2), pp. 307-313.
- Herz, U., Braun, A., Ruckert, R. & Renz, H. (1998) Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness, *Clin Exp Allergy*, 28(5), pp. 625-634.
- Herz, U., Lump, U., Da Palma, J.C., Enssle, K., Takatsu, K., Schnoy, N., Daser, A., Kottgen, E., Wahn, U. & Renz, H. (1996) The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma, *Immunol Cell Biol*, 74(2), pp. 209-217.
- Hogan, S.P., Mould, A., Kikutani, H., Ramsay, A.J. & Foster, P.S. (1997) Aeroallergen-induced eosinophilic inflammation, lung damage, and airways hyperreactivity in mice can occur independently of IL-4 and allergen-specific immunoglobulins, *J Clin Invest*, 99(6), pp. 1329-1339.

- Holt, P.G., Macaubas, C., Stumbles, P.A. & Sly, P.D. (1999) The role of allergy in the development of asthma, *Nature*, 402(6760 Suppl), pp. B12-17.
- Horigome, K., Bullock, E.D. & Johnson, E.M., Jr. (1994) Effects of nerve growth factor on rat peritoneal mast cells. Survival promotion and immediate-early gene induction, *J Biol Chem*, 269(4), pp. 2695-2702.
- Horigome, K., Pryor, J.C., Bullock, E.D. & Johnson, E.M., Jr. (1993) Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation, *J Biol Chem*, 268(20), pp. 14881-14887.
- Hoyle, G.W., Graham, R.M., Finkelstein, J.B., Nguyen, K.P., Gozal, D. & Friedman, M. (1998) Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18(2), pp. 149-157.
- Hoyle, G.W., Mercer, E.H., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1993) Expression of NGF in sympathetic neurons leads to excessive axon outgrowth from ganglia but decreased terminal innervation within tissues, *Neuron*, 10(6), pp. 1019-1034.
- Hunter, D.D., Myers, A.C. & Udem, B.J. (2000) Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons, *Am J Respir Crit Care Med*, 161(6), pp. 1985-1990.
- Janiszewski, J., Bienenstock, J. & Blennerhassett, M.G. (1994) Picomolar doses of substance P trigger electrical responses in mast cells without degranulation, *Am J Physiol*, 267(1 Pt 1), pp. C138-145.
- Jarjour, N.N., Calhoun, W.J., Kelly, E.A., Gleich, G.J., Schwartz, L.B. & Busse, W.W. (1997) The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma, *Am J Respir Crit Care Med*, 155(5), pp. 1515-1521.
- Jippo, T., Ushio, H., Hirota, S., Mizuno, H., Yamatodani, A., Nomura, S., Matsuda, H. & Kitamura, Y. (1994) Poor response of cultured mast cells derived from mi/mi mutant mice to nerve growth factor, *Blood*, 84(9), pp. 2977-2983.
- Joos, G.F., Germonpre, P.R. & Pauwels, R.A. (2000) Neural mechanisms in asthma, *Clin Exp Allergy*, 30(Suppl 1), pp. 60-65.
- Kaltreider, H.B., Ichikawa, S., Byrd, P.K., Ingram, D.A., Kishiyama, J.L., Sreedharan, S.P., Warnock, M.L., Beck, J.M. & Goetzl, E.J. (1997)

- Upregulation of neuropeptides and neuropeptide receptors in a murine model of immune inflammation in lung parenchyma, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 16(2), pp. 133-144.
- Kassel, O., de Blay, F., Duvernelle, C., Olgart, C., Israel-Biet, D., Krieger, P., Moreau, L., Muller, C., Pauli, G. & Frossard, N. (2001) Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose, *Clin Exp Allergy*, 31(9), pp. 1432-1440.
- Kawamoto, K., Okada, T., Kannan, Y., Ushio, H., Matsumoto, M. & Matsuda, H. (1995) Nerve growth factor prevents apoptosis of rat peritoneal mast cells through the trk proto-oncogene receptor, *Blood*, 86(12), pp. 4638-4644.
- Kay, A.B. (1996) Pathology of mild, severe, and fatal asthma, *Am J Respir Crit Care Med*, 154(2 Pt 2), pp. S66-69.
- Kerzel, S., Path, G., Nockher, W.A., Quarcoo, D., Raap, U., Groneberg, D.A., Dinh, Q.T., Fischer, A., Braun, A. & Renz, H. (2003) Pan-neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28(2), pp. 170-178.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Kusunoki, T., Hosoi, S. & Mikawa, H. (1991a) Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production, *Eur J Immunol*, 21(1), pp. 137-141.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C. & Mikawa, H. (1991b) Stimulation of Ig production and growth of human lymphoblastoid B-cell lines by nerve growth factor, *Immunology*, 72(3), pp. 451-452.
- Kobayashi, T., Miura, T., Haba, T., Sato, M., Serizawa, I., Nagai, H. & Ishizaka, K. (2000) An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model, *J Immunol*, 164(7), pp. 3855-3861.
- Laine, P., Naukkarinen, A., Heikkila, L., Penttila, A. & Kovanen, P.T. (2000) Adventitial mast cells connect with sensory nerve fibers in atherosclerotic coronary arteries, *Circulation*, 101(14), pp. 1665-1669.
- Lambiase, A., Bonini, S., Micera, A., Magrini, L., Bracci-Laudiero, L. & Aloe, L. (1995) Increased plasma levels of nerve growth factor in vernal

- keratoconjunctivitis and relationship to conjunctival mast cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36(10), pp. 2127-2132.
- Lambrecht, B.N., Salomon, B., Klatzmann, D. & Pauwels, R.A. (1998) Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice, *J Immunol*, 160(8), pp. 4090-4097.
- Leon, A., Buriani, A., Dal Toso, R., Fabris, M., Romanello, S., Aloe, L. & Levi-Montalcini, R. (1994) Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), pp. 3739-3743.
- Leung, R., Wong, G., Lau, J., Ho, A., Chan, J.K., Choy, D., Douglass, C. & Lai, C.K. (1997) Prevalence of asthma and allergy in Hong Kong schoolchildren: an ISAAC study, *Eur Respir J*, 10(2), pp. 354-360.
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later, *Science*, 237(4819), pp. 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., Dal Toso, R., della Valle, F., Skaper, S.D. & Leon, A. (1995) Update of the NGF saga, *J Neurol Sci*, 130(2), pp. 119-127.
- Levi-Montalcini, R., Skaper, S.D., Dal Toso, R., Petrelli, L. & Leon, A. (1996) Nerve growth factor: From neurotrophin to neurokine, *Trends Neurosci*, 19(11), pp. 514-520.
- Lewin, G.R. & Barde, Y.A. (1996) Physiology of the neurotrophins, *Annu Rev Neurosci*, 19, pp. 289-317.
- Liang, Y., Marcusson, J.A., Jacobi, H.H., Haak-Frendscho, M. & Johansson, O. (1998) Histamine-containing mast cells and their relationship to NGF-immunoreactive nerves in prurigo nodularis: A reappraisal, *J Cutan Pathol*, 25(4), pp. 189-198.
- Lindsay, R.M. & Harmar, A.J. (1989) Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons, *Nature*, 337(6205), pp. 362-364.
- Liu, M.C., Hubbard, W.C., Proud, D., Stealey, B.A., Galli, S.J., Kagey-Sobotka, A., Bleeker, E.R. & Lichtenstein, L.M. (1991) Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes, *Am Rev Respir Dis*, 144(1), pp. 51-58.

- Lommatzsch, M., Braun, A. & Renz, H. (2003) Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us, *Ann N Y Acad Sci*, 992, pp. 241-249.
- Lundberg, J.M. (1995) Tachykinins, sensory nerves, and asthma - an overview, *Can J Physiol Pharmacol*, 73(7), pp. 908-914.
- MacLean, D.B., Lewis, S.F. & Wheeler, F.B. (1988) Substance P content in cultured neonatal rat vagal sensory neurons: the effect of nerve growth factor, *Brain Res*, 457(1), pp. 53-62.
- Maroder, M., Bellavia, D., Mecco, D., Napolitano, M., Stigliano, A., Alesse, E., Vacca, A., Giannini, G., Frati, L., Gulino, A. & Screpanti, I. (1996) Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival, *J Immunol*, 157(7), pp. 2864-2872.
- Marshall, J.S., Stead, R.H., McSharry, C., Nielsen, L. & Bienenstock, J. (1990) The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. I. Mechanism of action of nerve growth factor, *J Immunol*, 144(5), pp. 1886-1892.
- Martin-Zanca, D., Barbacid, M. & Parada, L.F. (1990) Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development, *Genes Dev*, 4(5), pp. 683-694.
- Matsuda, H., Kannan, Y., Ushio, H., Kiso, Y., Kanemoto, T., Suzuki, H. & Kitamura, Y. (1991) Nerve growth factor induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells, *J Exp Med*, 174(1), pp. 7-14.
- McKay, D.M. & Bienenstock, J. (1994) The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract, *Immunol Today*, 15(11), pp. 533-538.
- Melamed, I., Kelleher, C.A., Franklin, R.A., Brodie, C., Hempstead, B., Kaplan, D. & Gelfand, E.W. (1996) Nerve growth factor signal transduction in human B lymphocytes is mediated by gp140trk, *Eur J Immunol*, 26(9), pp. 1985-1992.
- Micera, A., Vigneti, E., Pickholtz, D., Reich, R., Pappo, O., Bonini, S., Maquart, F.X., Aloe, L. & Levi-Schaffer, F. (2001) Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a

- direct role for this factor in tissue repair, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(11), pp. 6162-6167.
- Murray, J.J., Tonnel, A.B., Brash, A.R., Roberts, L.J., 2nd, Gosset, P., Workman, R., Capron, A. & Oates, J.A. (1985) Prostaglandin D2 is released during acute allergic bronchospasm in man, *Trans Assoc Am Physicians*, 98, pp. 275-280.
- Mutoh, T., Bonham, A.C. & Joad, J.P. (2000) Substance P in the nucleus of the solitary tract augments bronchopulmonary C fiber reflex output, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(4), pp. R1215-1223.
- Nassenstein, C., Braun, A., Erpenbeck, V.J., Lommatzsch, M., Schmidt, S., Krug, N., Luttmann, W., Renz, H. & Virchow, J.C., Jr. (2003) The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma, *J Exp Med*, 198(3), pp. 455-467.
- Nawa, H., Kotani, H. & Nakanishi, S. (1984) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing, *Nature*, 312(5996), pp. 729-734.
- Neuhaus-Steinmetz, U., Glaab, T., Daser, A., Braun, A., Lommatzsch, M., Herz, U., Kips, J., Alarie, Y. & Renz, H. (2000) Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation, *Int Arch Allergy Immunol*, 121(1), pp. 57-67.
- Nilsson, G., Forsberg-Nilsson, K., Xiang, Z., Hallbook, F., Nilsson, K. & Metcalfe, D.D. (1997) Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor, *Eur J Immunol*, 27(9), pp. 2295-2301.
- Ninan, T.K., Russell, G., Shaw, R.A., Crane, J., O'Donnell, T.V., Porteous, L.E. & Coleman, E.D. (1992) Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart
Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population: 1975-89, *Bmj*, 304(6831), pp. 873-875.
- Noga, O., Englmann, C., Hanf, G., Grutzkau, A., Seybold, J., Kunkel, G. & Guhl, S. (2003) The production, storage and release of the neurotrophins

- nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics
- Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils, *Clin Exp Allergy*, 33(5), pp. 649-654.
- Oelmann, E., Sreter, L., Schuller, I., Serve, H., Koenigsmann, M., Wiedenmann, B., Oberberg, D., Reufi, B., Thiel, E. & Berdel, W.E. (1995) Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling, *Cancer Res*, 55(10), pp. 2212-2219.
- Olgart, C. & Frossard, N. (2001) Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids, *Eur Respir J*, 18(1), pp. 115-121.
- Path, G., Braun, A., Meents, N., Kerzel, S., Quarcoo, D., Raap, U., Hoyle, G.W., Nockher, W.A. & Renz, H. (2002) Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor, *Am J Respir Crit Care Med*, 166(6), pp. 818-826.
- Pearce, F.L. & Thompson, H.L. (1986) Some characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells stimulated with nerve growth factor, *J Physiol*, 372, pp. 379-393.
- Pincelli, C. (2000) Nerve growth factor and keratinocytes: a role in psoriasis, *Eur J Dermatol*, 10(2), pp. 85-90.
- Quarcoo, D., Schulte-Herbrüggen, O., Lommatzsch, M., Schierhorn, K., Hoyle, G.W., Renz, H. & Braun, A. (2004) Nerve growth factor induces increased airway inflammation via a neuropeptide-dependent mechanism in a transgenic animal model of allergic airway inflammation, *Clinical and Experimental Allergy*.
- Raychaudhuri, S.K., Raychaudhuri, S.P., Weltman, H. & Farber, E.M. (2001) Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells, *Arch Dermatol Res*, 293(6), pp. 291-295.

- Reynolds, P.N., Holmes, M.D. & Scicchitano, R. (1997) Role of tachykinins in bronchial hyper-responsiveness, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 24(3-4), pp. 273-280.
- Rozniecki, J.J., Dimitriadou, V., Lambracht-Hall, M., Pang, X. & Theoharides, T.C. (1999) Morphological and functional demonstration of rat dura mater mast cell-neuron interactions in vitro and in vivo, *Brain Res*, 849(1-2), pp. 1-15.
- Sanico, A.M., Stanisiz, A.M., Gleeson, T.D., Bora, S., Proud, D., Bienenstock, J., Koliatsos, V.E. & Togias, A. (2000) Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways, *Am J Respir Crit Care Med*, 161(5), pp. 1631-1635.
- Sawada, J., Itakura, A., Tanaka, A., Furusaka, T. & Matsuda, H. (2000) Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways, *Blood*, 95(6), pp. 2052-2058.
- Scheerens, H., Buckley, T.L., Muis, T., Van Loveren, H. & Nijkamp, F.P. (1996) The involvement of sensory neuropeptides in toluene diisocyanate-induced tracheal hyperreactivity in the mouse airways, *Br J Pharmacol*, 119(8), pp. 1665-1671.
- Shanahan, F., Denburg, J.A., Fox, J., Bienenstock, J. & Befus, D. (1985) Mast cell heterogeneity: Effects of neuroenteric peptides on histamine release, *J Immunol*, 135(2), pp. 1331-1337.
- Shaw, R.A., Crane, J., O'Donnell, T.V., Porteous, L.E. & Coleman, E.D. (1990) Increasing asthma prevalence in a rural New Zealand adolescent population: 1975-89, *Arch Dis Child*, 65(12), pp. 1319-1323.
- Shibayama, E. & Koizumi, H. (1996) Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues, *Am J Pathol*, 148(6), pp. 1807-1818.
- Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A. & Barbacid, M. (1994) Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene, *Nature*, 368(6468), pp. 246-249.
- Stead, R.H., Tomioka, M., Quinonez, G., Simon, G.T., Felten, S.Y. & Bienenstock, J. (1987) Intestinal mucosal mast cells in normal and

- nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(9), pp. 2975-2979.
- Susaki, Y., Shimizu, S., Katakura, K., Watanabe, N., Kawamoto, K., Matsumoto, M., Tsudzuki, M., Furusaka, T., Kitamura, Y. & Matsuda, H. (1996) Functional properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor, *Blood*, 88(12), pp. 4630-4637.
- Suzuki, R., Furuno, T., McKay, D.M., Wolvers, D., Teshima, R., Nakanishi, M. & Bienenstock, J. (1999) Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P, *J Immunol*, 163(5), pp. 2410-2415.
- Tam, S.Y., Tsai, M., Yamaguchi, M., Yano, K., Butterfield, J.H. & Galli, S.J. (1997) Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells, *Blood*, 90(5), pp. 1807-1820.
- Tokuoka, S., Takahashi, Y., Masuda, T., Tanaka, H., Furukawa, S. & Nagai, H. (2001) Disruption of antigen-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in low affinity neurotrophin receptor p75 gene deficient mice, *Br J Pharmacol*, 134(7), pp. 1580-1586.
- Torcia, M., Bracci-Laudiero, L., Lucibello, M., Nencioni, L., Labardi, D., Rubartelli, A., Cozzolino, F., Aloe, L. & Garaci, E. (1996) Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes, *Cell*, 85(3), pp. 345-356.
- Turner, H. & Kinet, J.P. (1999) Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI, *Nature*, 402(6760 Suppl), pp. B24-30.
- Ulupinar, E., Unal, N. & Erzurumlu, R.S. (2004) Morphometric analysis of embryonic rat trigeminal neurons treated with different neurotrophins, *Anat Rec*, 277A(2), pp. 396-407.
- Vedder, H., Affolter, H.U. & Otten, U. (1993) Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development, *Neuropeptides*, 24(6), pp. 351-357.
- Veronesi, B., Carter, J.D., Devlin, R.B., Simon, S.A. & Oortgiesen, M. (1999) Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory

- cytokines in a human bronchial epithelial cell line, *Neuropeptides*, 33(6), pp. 447-456.
- Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F. & Alarie, Y. (1993) Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract, *Arch Toxicol*, 67(7), pp. 478-490.
- Vijayaraghavan, R., Schaper, M., Thompson, R., Stock, M.F., Boylstein, L.A., Luo, J.E. & Alarie, Y. (1994) Computer assisted recognition and quantitation of the effects of airborne chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice, *Arch Toxicol 1994+ADs*, 68(8), pp. 490-499.
- Virchow, J.C., Julius, P., Lommatzsch, M., Luttmann, W., Renz, H. & Braun, A. (1998) Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation, *Am J Respir Crit Care Med*, 158(6), pp. 2002-2005.
- Wenzel, S.E., Westcott, J.Y., Smith, H.R. & Larsen, G.L. (1989) Spectrum of prostanoid release after bronchoalveolar allergen challenge in atopic asthmatics and in control groups. An alteration in the ratio of bronchoconstrictive to bronchoprotective mediators, *Am Rev Respir Dis*, 139(2), pp. 450-457.
- Williams, C.M. & Galli, S.J. (2000) Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice, *J Exp Med*, 192(3), pp. 455-462.
- Xiang, Z. & Nilsson, G. (2000) IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells, *Clin Exp Allergy*, 30(10), pp. 1379-1386.
- Yamaguchi, M., Lantz, C.S., Oettgen, H.C., Katona, I.M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J.P. & Galli, S.J. (1997) IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: Evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions, *J Exp Med*, 185(4), pp. 663-672.
- Zhu, Z.W., Friess, H., Wang, L., Bogardus, T., Korc, M., Kleeff, J. & Buchler, M.W. (2001) Nerve growth factor exerts differential effects on the growth of human pancreatic cancer cells, *Clin Cancer Res*, 7(1), pp. 105-112.

IX PUBLIKATION

Augmentation of Allergic Early Phase Reaction by Nerve Growth Factor

Günter Päch, Armin Braun, **Nina Meents**, Sebastian Kerzel, David Quarcoo, Ulrike Raap, Gary W. Hoyle, Wolfgang A. Nockher and Harald Renz
American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, Vol 166. pp 818-826,
2002. DOI: 10.1164/rccm.200202-134OC

X LEHRERVERZEICHNIS

Meine akademischen Lehrer waren Damen/ Herren in Marburg

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Eilers, Feuser, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Koolmann, Krieg, Lammel, Lang, Lennartz, Lippert, Maisch, Moll, Müller, T. Müller, Oertel, Renz, Röhm, Schäfer, Steiniger, Sundermeyer, Weihe

Meine akademischen Lehrer waren Damen/ Herren in Leipzig

Becker, Bührdel, Glander, Höckel, Keim, Oeken, Preiß, Salis-Soglio, Sandholzer, Schreinicke, Wagner, Wiedemann, Viehweg

Meine akademischen Lehrer im Praktischen Jahr waren Damen/ Herren

Kiskinis, Moessner, Passweg, Schauer, Schnarwyler, Schuler, von Castelberg

XI DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. H. Renz ganz besonders, dass er mir meine Dissertation an der Philipps-Universität Marburg in seiner Abteilung ermöglicht und mir dieses spannende und interessante Thema überlassen hat. Ich danke ihm herzlich für die sehr freundliche Unterstützung, sowie die Mühe und die Zeit, die er sich stets sofort für die Arbeit genommen hat.

Besonderer Dank gilt auch Dr. Günter Päth, der mich hervorragend betreut hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. A. Braun bedanken für die Unterstützung und seine gute Betreuung.

Zu großem Dank bin ich auch den weiteren Mitarbeitern des Laboratoriums für Klinische Chemie verpflichtet, insbesondere den medizinisch-technischen AssistentInnen für ihre freundliche und hilfreiche Mitarbeit.

Von Herzen danke ich Sebastian Hölzel für seine große Unterstützung nicht nur in Formatierungsfragen.

Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt meinen Eltern, die mich in allem so sehr unterstützen und beistehen und mir meinen bisherigen Werdegang erst ermöglicht haben.