

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz

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

**Einfluss der Neurotrophine auf Proliferation,
Stoffwechsel und Differenzierung von
Fibroblasten zu Myofibroblasten
in der Pathogenese des allergischen
Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johanna Napierala

aus Langenbielau

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg am 30.04.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Harald Renz

Korreferent: PD Dr. med. Michael Zemlin

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....6-20

1.1 ASTHMA BRONCHIALE.....6-14

1.2 FIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLASTEN.....14-15

1.3 NEUROTROPINE.....15-20

II. FRAGESTELLUNG.....21

2.1 FRAGESTELLUNG.....21

III. MATERIAL UND METHODEN.....22-37

3.1 ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....22-26

3.1.1 Fibroblasten..... 22

3.1.2 Auftauen gefrorener Fibroblasten.....22

3.1.3 Isolierung von primären Fibroblasten.....23

3.1.4 Kultivierung von Fibroblasten.....23-24

3.1.5 Stimulation von Fibroblasten mit TGF- β 1.....24-25

3.1.6 CellTiter-BlueTM Cell Viability Assay.....25-26

3.2 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....26-30

3.2.1 Neurotrophin-ELISA.....26-29

3.2.1.1 BDNF-ELISA.....27-28

3.2.1.2 NGF-ELISA.....28

3.2.1.3	NT-3-ELISA.....	28
3.2.1.4	NT-4-ELISA.....	29
3.2.2	Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence).....	29-30
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	31-36
3.3.1	RNA-Gewinnung mittels RNeasy Mini Kit Qiagen.....	31
3.3.2	DNA-Verdau mit DNA-free™ von Ambion	32
3.3.3	Reverse Transkription und –RT mit SuperScript™ II	32-33
3.3.4	REDTaq™ Ready Mix-PCR.....	34-35
3.3.5	DNA-Gel.....	35
3.3.6	Gelelektrophorese und Gelauswertung.....	35-36
3.4	HISTOLOGIE.....	36-37
3.4.1	Ansetzen der Zellen.....	36
3.4.2	Fixierung und HE-Färbung	36-37
3.5	STATISTIK.....	37
 <u>IV. VERSUCHSERGEBNISSE.....</u>		<u>38-59</u>
4.1	GESTEIGERTE NEUROTROPHIN-PRODUKTION DER MYOFIBROBLASTEN IM VERGLEICH ZU FIBROBLASTEN.....	38-48
4.1.1	NT-RNA-Expression.....	38-39
4.1.2	NT-Produktion.....	40-48
4.1.2.1	Gesteigerte NT-Produktion der Myofibroblasten.....	40-43
4.1.2.2	NT-Produktion in primären Zellen.....	44-47
4.1.2.3	Vergleich Fibroblasten-Linie mit Fibroblasten-Linie.....	47-48
4.2	UNTERSCHIEDLICHE NTR-EXPRESSION BEI FIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLASTEN.....	48-50
4.3	ERHÖHTER STOFFWECHSEL DER MYOFIBROBLASTEN GEGENÜBER DEN FIBROBLASTEN UND BETEILIGUNG DER	

NEUROTROPHINE AM STOFFWECHSEL.....	51-52
4.4 STÄRKERE PROLIFERATION VON MYOFIBROBLASTEN IM VERGLEICH ZU FIBROBLASTEN UND NT-BETEILIGUNG AN DER PROLIFERATION.....	53-54
4.5 UNTERSCHIEDE IN DER MORPHOLOGIE ZWISCHEN FIBROBLASTEN UND MYOFIBROBLASTEN UND BETEILIGUNG DER NEUROTROPHINE AN DER DIFFERENZIERUNG VON FIBROBLASTEN ZU MYOFIBROBLASTEN.....	55-60
<u>V. DISKUSSION.....</u>	61-69
<u>VI. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	70-71
<u>VII. LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	72-86
<u>VIII. ANHANG.....</u>	87-95
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	87-89
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	90-91
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	92
CURRICULUM VITAE.....	93
ERKLÄRUNG.....	94
DANKSAGUNG.....	95

I. EINLEITUNG

1.1 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, die durch anfallsweise Atemnot mit expiratorischem Stridor und produktivem Husten charakterisiert ist. Asthma lässt sich unterteilen in allergisches (extrinsisches oder atopisches) Asthma bronchiale, ausgelöst durch allergisierende Stoffe wie Hausstaubmilbenkot oder Katzenepithel, und nicht-allergisches (intrinsisches) Asthma bronchiale, ausgelöst durch respiratorische Infekte, Analgetika oder chemisch-irritativ und toxisch wirkende Stoffe (Rochat, 2005).

Die Prävalenz dieser Erkrankung hat sich in den letzten 20 Jahren vor allem in den Industrieländern fast verdoppelt. Bis zu 5 % der Bevölkerung sind betroffen. Dies ist zum einen zurückzuführen auf genetische Prädisposition (Cookson and Moffatt, 2000), zum anderen auf Umweltfaktoren wie veränderte Hygiene und Lebensstandard.

In diesem Zusammenhang wurden zwei Hypothesen aufgestellt. Die Umwelthypothese postuliert, dass das gehäufte Auftreten von Allergien auf vermehrte Umweltverschmutzung zurückzuführen ist. Dagegen besagt die Hygienehypothese, dass Umweltverhältnisse in den ersten Lebensjahren eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Immunsystems spielen. Die hygienischen Bedingungen haben sich im Laufe der Jahre fortlaufend verbessert. Heutzutage haben immer weniger Kinder Kontakt zu unreinen Oberflächen oder Gegenständen, sodass ihr Abwehrsystem nicht gefördert wird. Auf Bauernhöfen zum Beispiel, wo Kinder in direkterem Kontakt zu ihrer Umwelt stehen, treten Allergien seltener auf (Strachan, 1989; Riedler et al., 2001). In den Industrieländern wird durch frühzeitige Gabe von Antibiotika bei banalen Infekten häufig die normale Ausreifung des Immunsystems unterdrückt. Für die Stärkung der Abwehrmechanismen ist es aber erforderlich, dass Kleinkinder im Verlauf ihrer Entwicklung an mehreren banalen Infektionen erkranken. Überdies stillen weniger Frauen ihre Kinder, wodurch dem noch nicht ausgereiften Immunsystem wichtige Immunglobuline fehlen. Zusätzlich ist die Keimflora des Magen-Darm-Trakts, die von

der Ernährung abhängt, für die immunologische Ausreifung bedeutsam. Gestillte Kinder zeigen eine andere Keimzusammensetzung im Darm als nicht gestillte. Zudem schützt Muttermilch vor der Entwicklung von Allergien (Oddy et al., 1999).

Die Exposition mit fremden Antigenen / Umweltantigenen im respiratorischen Trakt verursacht normalerweise keine entzündliche Reaktion. Die Schleimhäute der Atemwege sind ständigem Kontakt mit nicht-toxischen Antigenen ausgesetzt. Es kommt hierbei nicht zur Ausbildung einer immunologischen Antwort. Um seine Gasaustauschfunktion ungestört beizubehalten und Antigene vom Immunsystem fernzuhalten, besitzt der Atmungstrakt Barrieren aus Schleimschichten und interzellulären tight junctions, wie sie in der Abbildung 1A zu sehen sind. Die Schleimhaut ist zwar für Antigene nicht vollkommen unpassierbar, es gibt allerdings aktive Mechanismen, die die Immunantwort unterdrücken. Dazu gehören die T_{Reg}-Zellen, die eine mögliche Antwort des Abwehrsystems suprimieren. So entwickelt sich eine Toleranz (Cohn et al., 2004).

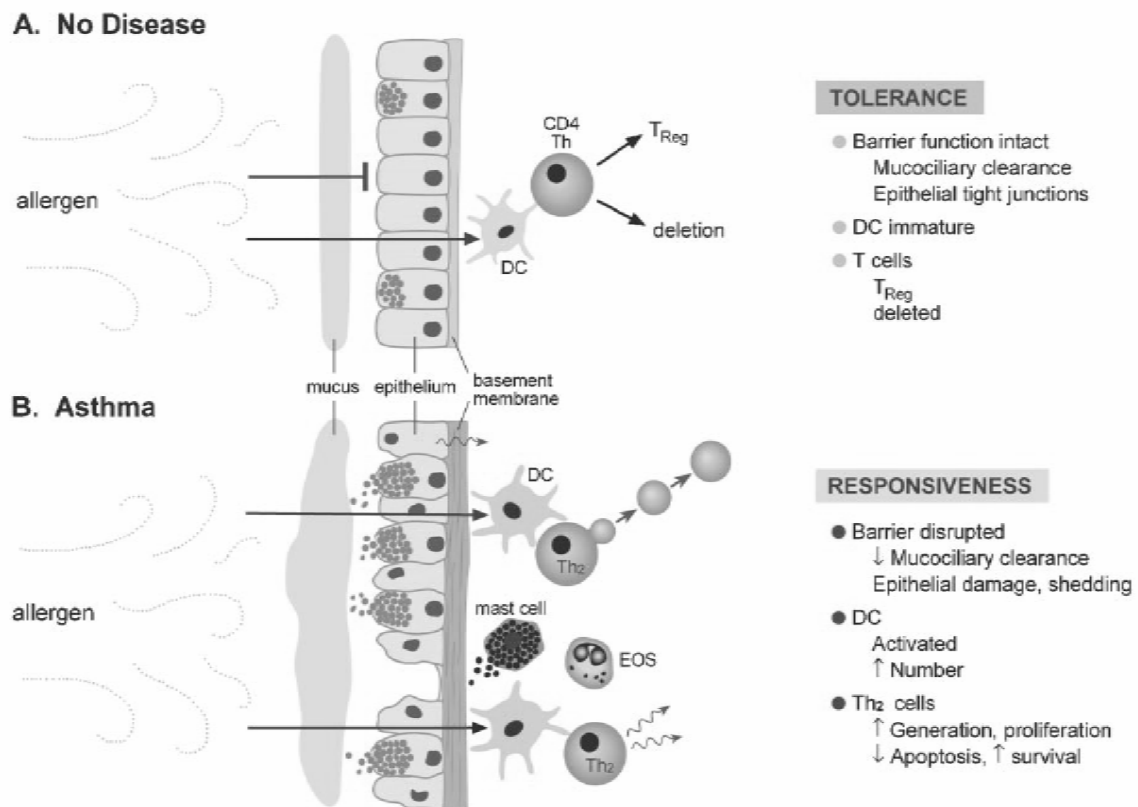


Abbildung 1: Unterschiedliche Reaktionen der Atemwege auf ein Allergen im Vergleich zwischen Gesunden und Asthmatikern. A: Im Gesunden induziert das inhalierte Allergen keine Entzündungsreaktion, weil Schutzmechanismen des Atemtraktes eine Toleranzentwicklung sichern. B: Bei Asthma fördern die entzündeten Atemwege eine Antwort des Immunsystems. Das inhalierte Allergen stimuliert weitere Th₂-Zell-Aktivierung, die Aktivierung von Entzündungszellen, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und den Untergang von Epithelzellen; außerdem werden Entzündungsvorgänge aufrechterhalten und die Atemwege umgebaut. (Nach: Cohn et al.: Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. Annu. Rev. Immunol. 2004, 22: 789-815)

Wird jedoch durch das inhalierte Antigen keine Toleranz induziert, kommt es zur Ausbildung einer Immunantwort. Dabei spielen die T-Lymphozyten, vor allem die CD4⁺T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) eine entscheidende Rolle. Wie in Abbildung 1B gezeigt wird, kommt es durch direkten Kontakt von Th-Zellen mit dem Antigen oder durch Kontakt mit antigen-präsentierenden dendritischen Zellen zur Sekretion von Zytokinen aus den Th-Zellen. Nach dem Zytokin-Muster unterscheidet man 3 verschiedene Populationen von Th-Zellen, die sich autokrin stimulieren und gegenseitig inhibieren: Th₁-Zellen produzieren vornehmlich IFN- γ , TNF- α und IL-2, während Th₂-Zellen hauptsächlich IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und GM-CSF synthetisieren

(Mosman et al., 1986; Paul et al., 1994). Diese beiden Subpopulationen entwickeln sich aus einer gemeinsamen Vorstufe, der Th₀-Zelle. Wird diese Th₀-Zelle, die in der nachfolgenden Abbildung 2 dargestellt ist, mit hohen Allergendosen und IL-12, IL-18 oder IFN-gamma aus aktivierten dendritischen Zellen, T-Lymphozyten oder Makrophagen stimuliert, differenziert sie sich zur Th₁-Zelle und vermittelt Entzündungsreaktionen (Hsieh et al., 1993). Zur Entwicklung der Th₂-Zelle, die für allergische Reaktionen verantwortlich ist, kommt es in Anwesenheit von niedrigen Allergendosen und IL-4 aus T-Lymphozyten, Mastzellen und Eosinophilen (Schmitt et al., 1990; Kung et al., 1995; Zuany-Amorim et al., 1998). Schließlich induziert IL-10 die Differenzierung der Th₀-Zelle zur Th₃-Zelle, die selbst IL-10 und TGF-β produziert und so anti-inflammatorisch und regulatorisch wirkt. Da nun diese drei verschiedenen Effektorzellen ebenfalls Zytokine produzieren, beeinflussen sie auf diese Weise die Differenzierung der Th₀-Zelle zur jeweiligen Effektorzelle (Parronchi et al., 1992).

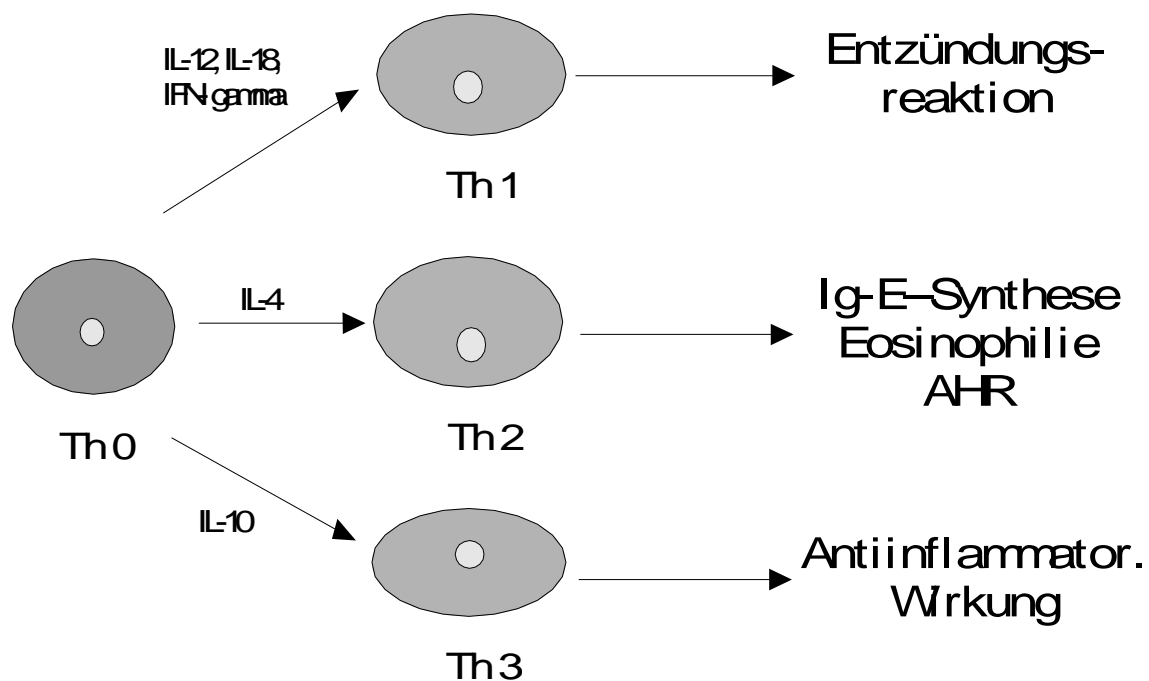


Abbildung 2: Die Differenzierung der Th₁-, Th₂- und der Th₃-Zelle aus einer gemeinsamen Vorstufe, der Th₀-Zelle. Abhängig von den Zytokinen, die die Th₀-Zelle stimulieren, entwickeln sich die verschiedenen Th-Zellen mit ihrem spezifischen Zytokin-Muster und ihrer spezifischen Wirkung. (Nach: Hahn: Die Rolle von IL-4 und IL-13 in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen, Dissertation 2003)

Beim allergischen Asthma bronchiale findet sich ein Ungleichgewicht von Th₁- und Th₂-Zellen, wobei die CD4⁺ Th₂-Zelle überwiegt. Von der Th₂-Zelle wird angenommen,

dass sie bei der Entstehung und Progression der Erkrankung eine wichtige Rolle spielt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Asthmatikern die Th₂-Zellen chronisch aktiviert sind und zusätzlich die Anzahl der Th₂-Zellen und auch die von dieser Zellart synthetisierten Zytokine v.a. IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 erhöht sind (Corrigan et al., 1988; Walker et al., 1991; Huang et al., 1995). Th₂-Zellen sind verantwortlich für die Ausbildung der typischen Merkmale des Asthma bronchiale wie Allergen-induzierte Entzündung mit Eosinophilie, Aktivierung von Mastzellen, IgE-Produktion, Atemwegshyperreaktivität und übermäßige Schleimproduktion (Lee et al., 1997; Rankin et al., 1994; Temann et al., 1998; Zhu et al., 1999).

Die asthmatische Entzündungsreaktion ist eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ 1 und lässt sich in eine frühe und eine späte Phase einteilen (siehe Abbildung 3). Die Früh-Phase-Reaktion beginnt mit dem Einatmen des Allergens, welches die Schleimhautbarriere durchdringt und von einer Antigen-präsentierenden Zelle aufgenommen wird (Holt et al., 2000). Diese dendritische Zelle wandert in die drainierenden Lymphknoten und präsentiert dort ihr aufgearbeitetes Antigen den T- und B-Lymphozyten über eine Interaktion zwischen MHC II und T- bzw. B-Zell-Rezeptoren in Gegenwart co-stimulatorischer Zytokine (Huh et al., 2003). Dabei kommt es durch IL-4 und IL-13 zum Isotypenwechsel der B-Zellen zur IgE-produzierenden Plasmazellen (Busse et al., 2001). Nachdem das IgE freigesetzt wird, gerät es in den Blutkreislauf und bindet dort an den hoch-affinen IgE-Rezeptor (Fcε RI) auf der Oberfläche von gewebsständigen Mastzellen und basophilen Granulozyten. Außerdem bindet es an den schwach-affinen IgE-Rezeptor (Fcε RII) auf der Oberfläche von Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten. Kommt es nun zu erneutem Kontakt der Mastzelle mit dem gleichen Antigen, führt dies zu einer Kreuzvernetzung der zellständigen Antikörper und die Zelle wird zur Freisetzung ihrer Granula angeregt. Diese Granula enthalten eine Vielzahl an Entzündungsmediatoren wie Histamin, Bradykinin, Tryptase, Chymase, Eicosanoide und Th₂-Zytokine (Jarjour et al., 1997; Wenzel et al., 1988). In Folge kommt es zu Kontraktion der glatten Muskulatur, Schleimsekretion, Vasodilatation und Austritt von Plasma aus den Gefäßen in die Zellzwischenräume. Dies führt zu Atemwegsobstruktion und den typischen Symptomen beim Asthmaanfall (Bousquet et al., 2000).

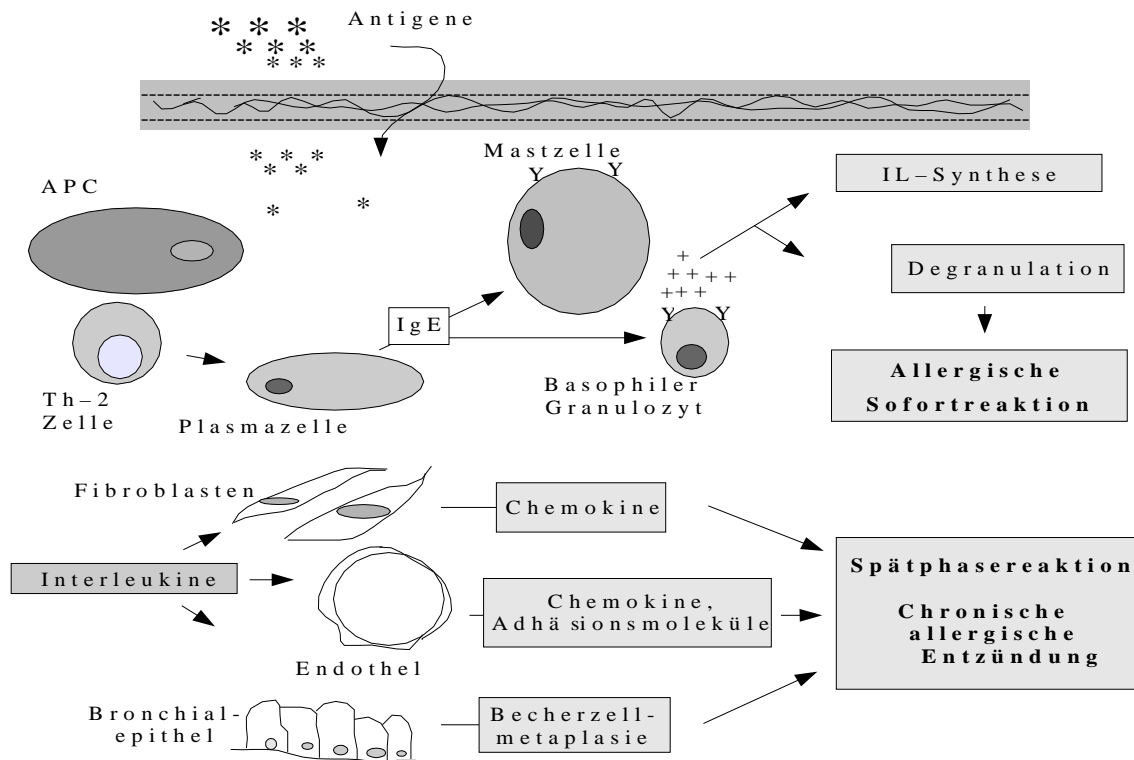


Abbildung 3: Allergische Reaktion. Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen den T- und B-Zellen präsentiert. Nach erneutem Kontakt des Antigens mit IgE kommt es zur Kreuzvernetzung der Effektorzelle und zur Degranulation. Die freigesetzten Mediatoren führen zur allergischen Sofortreaktion. Gleichzeitig werden Interleukine von den Effektorzellen gebildet, die die allergische Reaktion aufrechterhalten und sogar verstärken. Ferner beeinflussen die Interleukine verschiedene Zellarten, die wiederum Chemokine und Adhäsionsmoleküle exprimieren und so die Spätphase-Reaktion und die chronische allergische Entzündung bewirken. (Nach: Hahn: Die Rolle von IL-4 und IL-13 in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen, Dissertation 2003)

Durch die Freisetzung von entzündlichen Zytokinen aus Mastzellen kommt es zur Spätphase-Reaktion, die erst einige Stunden nach Allergenexposition beginnt. Sie ist gekennzeichnet durch Rekrutierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten, Th₂-Zellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Bousquet et al., 2000; Rothenberg et al., 1998). Eine zentrale Rolle spielen hierbei die Eosinophilen, für deren Aktivierung v.a. Th₂-Zytokine (IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13) von Bedeutung sind. Sobald die Eosinophilen die Lunge erreichen, setzen sie ihre Mediatoren frei, u.a. major basic protein, eosinophil cationic protein, eosinophil peroxidase, Zytokine wie TNF- α , GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-13, Chemokine wie RANTES und Eotaxin und platelet derived

growth factor (Rothenberg et al., 1998). Diese Faktoren bewirken eine Verletzung des Gewebes, stimulieren die Mukusproduktion und Fibrosierung und induzieren Bronchospasmus und Atemwegshyperreaktivität. Außerdem werden weitere Eosinophile rekrutiert und aktiviert. Eosinophile Granulozyten haben folglich eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung und Progression des Asthma bronchiale. Über Zytokinproduktion kommt es zur Progression der Entzündung und Aktivierung von Th₂-Zellen. Durch die Stimulation der subepithelialen Fibroblasten beginnt der strukturelle Umbau (Rothenberg et al., 1998; Mattes et al., 2002; Shi et al., 2000).

Morphologische Veränderungen der Atemwege, das sogenannte airway remodeling, sind Folge dieser Gewebsverletzungen und Einwirkung von Entzündungsmediatoren auf Gewebszellen. Vor allem das Epithel der Atemwege ist verletzt und entzündet (Ricciardolo et al., 2003). Ungewiss dessen, ob zuerst ein viraler oder bakterieller Infekt das Epithel geschädigt hat oder die Zytokine der Th₂-Zellen und der Eosinophilen, so finden sich in der Umgebung des Epithels Entzündungsmediatoren, die von Eosinophilen, Mastzellen und Lymphozyten gebildet werden. Zum einen schädigen diese Zytokine die Epithelien, zum anderen kommt es zu Zytokinfreisetzung aus den Epithelzellen, darunter IL-8, GM-CSF, RANTES (White et al., 1997). Dies hat zur Folge, dass neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen rekrutiert und aktiviert werden und das Überleben der Eosinophilen verlängert wird. Ferner werden Endothelin-1, Endothelin-2 und TGF-β1 ausgeschüttet (Tschumperlin et al., 2003; Fagan et al., 2001). Auf diese Weise kommt es zur Interaktion zwischen Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten, die hyperplasieren und hypertrophieren. Auch finden sich vermehrt Myofibroblasten, die eine kontraktile und eine synthetisierende Komponente besitzen. Die synthetische Komponente dient der Produktion von Proteinen für die extrazelluläre Matrix.

Die Funktion dieser extrazellulären Matrix und der Gewebszellen ist die Reparatur von beschädigtem Gewebe. In diesem Reparaturprozess kommt es zu einer Verdickung der bronchialen Wände durch Infiltration der Bronchialschleimhaut mit eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten (Th₂) und Entzündungsmediatoren (Laitinen et al., 1997). Daraus resultiert eine Einengung des Lumens, welche zusätzlich durch den Mukus verstärkt wird, den die hypertrophierten Becherzellen und metaplastierten Epithelzellen produzieren (Homer et al., 2000; Roberts et al., 1997; Black et al., 1997; Cohn et al., 1997). Unterhalb der Basalmembran findet

sich zudem eine Ablagerung von Fibronectin, Tenascin und Kollagen Typ I, III und V, das v.a. von den Myofibroblasten produziert wird. Ferner ist in der extrazellulären Matrix der Gehalt an Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Glukosaminglykanen erhöht (Roberts et al., 1997; Roche et al., 1989; Awadh et al., 1998; Chu et al., 1998; Wilson et al., 1997; Brewster et al., 1999). Außerdem tritt eine verstärkte Dilatation der Gefäße auf, die mit erhöhter Permeabilität und konsekutiven Ödemen einhergeht (Homer et al., 2000).

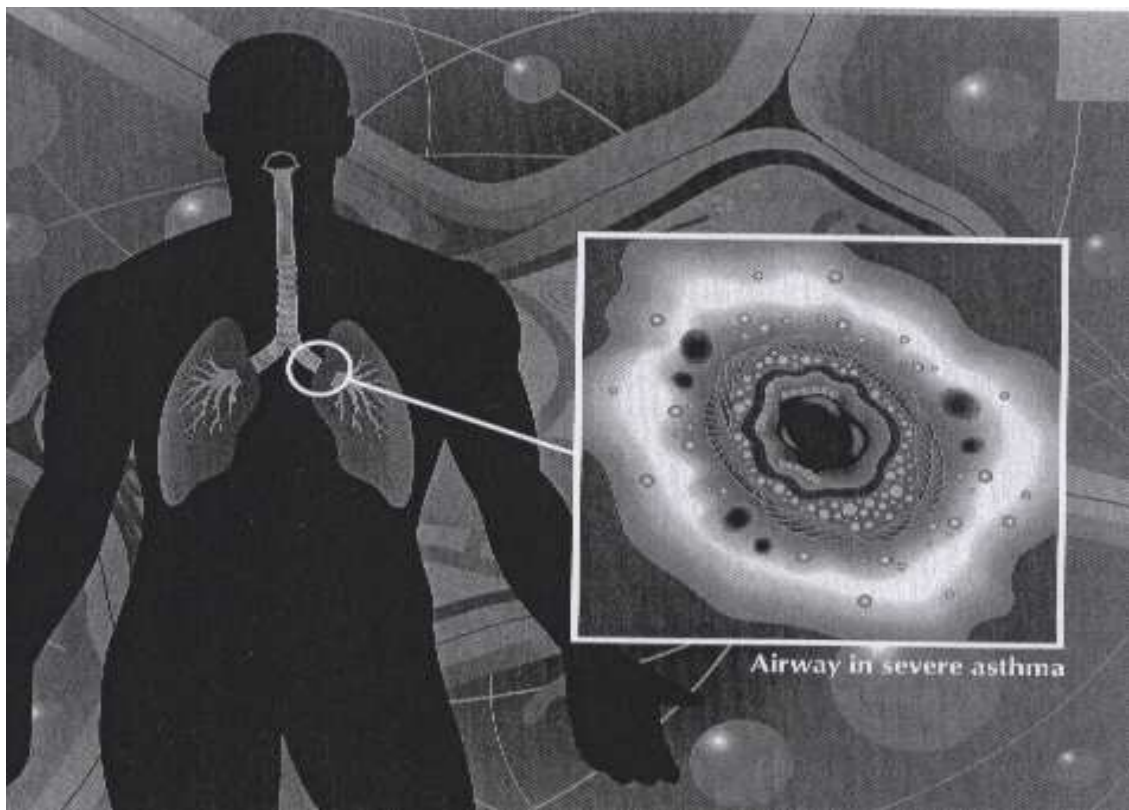


Abbildung 4: Strukturelle Veränderungen des Bronchialsystems im Asthma. Hypertrophierte Bronchialmuskulatur, hyperplastische Becherzellen und Schleimdrüsen und Infiltration der Schleimhaut durch eosinophile Granulozyten führen zu Einengung des Lumens. (Nach: Church, Arion: Simply Allergy)

Aus den oben genannten strukturellen Veränderungen und der Entzündung erfolgt die Atemwegshyperreaktivität (AHR). Sie ist definiert als eine verstärkte Antwort in Form von Bronchokonstriktion auf unspezifische Reize (Boushey et al., 1982). Diese Veränderungen wie Epithelverletzung, Einengung des Lumens durch Mukusproduktion und verstärkte Kontraktion der glatten Muskelzellen spielen bei der Entstehung der AHR eine entscheidende Rolle. Zusätzlich finden sich vermehrte Ablagerung von

Kollagen, Störung in der neuronalen Regulation, vaskuläre Permeabilität und verschiedene Entzündungsmediatoren (Cockcroft et al., 1997).

Alle diese strukturellen Veränderungen und sogar die Entzündung können schon Jahre vor Auftreten der asthmatischen Symptomatik gefunden werden (Pohunek et al., 2000). Atemnot und Husten treten wahrscheinlich erst in Erscheinung, wenn ein kritischer Punkt im airway remodeling erreicht ist.

1.2 Fibroblasten und Myofibroblasten

Fibroblasten sind mesenchymaler Herkunft und gehören zur Familie der Supportzellen. Man findet sie im Bindegewebe. Das Hauptprodukt der Fibroblasten ist das Kollagen, v.a. Typ I, III und V, das zusammen mit Proteoglykanen die extrazelluläre Matrix bildet. Außerdem werden Metalloproteinasen exprimiert, die die extrazelluläre Matrix auf- und abbauen bzw. umbauen (Knight et al., 2001). Vor allem nach Gewebsverletzungen spielen Fibroblasten eine wichtige Rolle. Gewebsschädigung ist ein Stimulus für Fibroblasten, zu proliferieren und Narbengewebe zu produzieren, wodurch sie die Reparatur des Gewebes einleiten. Allerdings kann nach länger dauernden Entzündungsreaktionen Fibrose auftreten.

Neben ihrer Funktion als strukturelle Zellen kommunizieren Fibroblasten mit Zellen ihrer Umgebung, darunter Epithelzellen und Entzündungszellen (Doucet et al., 1998), über Expression verschiedener Zytokine wie IL-1, Neurotrophine, TGF- β 1 und platelet derived growth factor (PDGF) (Kovacs et al., 1991; McGowan et al., 1992). In diesem Zusammenhang ist TGF- β 1 von großer Bedeutung (Tomasek et al., 2002; Shakar et al., 1999; Bogatkevich et al., 2001; Serini et al., 1998; Dugina et al., 2001), der über die Integrinfokaladhäsionskinase-Signalkaskade wirkt (Thannickel et al., 2003). TGF- β 1 wirkt stark chemotaktisch auf Fibroblasten und aktiviert sie zur Proliferation. Ferner fördert er die Fibronectin- und Kollagensynthese und induziert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über den Smad3-Weg (Sacco et al., 1992; Phan et al., 2002; Feng et al., 2005; Phan 2008). Ähnliche Effekte hat NGF aus der Gruppe der Neurotrophine. NGF induziert sowohl Aktivierung als auch Proliferation und verstärkt zudem die Kontraktion der Myofibroblasten (Micera et al., 2001). Myofibroblasten

haben strukturelle Merkmale sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen (Walker et al., 2001). So synthetisieren sie Proteine für die extrazelluläre Matrix und besitzen auch kontraktile Elemente wie Myosin und alpha smooth-muscle actin zum Kontrahieren (Brewster et al., 1990). Im Gegensatz dazu inhibiert IL-1 diese Prozesse wie Differenzierung zu Myofibroblasten, verstärkte Kontraktion und Kollagendeposition. Vielmehr induziert es die NO-Synthase und fördert auf diese Weise die Apoptose (Zhang et al., 1997).

1.3 Neurotrophine und ihre Funktionen

Neurotrophine sind eine Klasse homologer Wachstumsfaktoren, die zunächst nur in Zusammenhang mit dem Nervensystem zu stehen schienen. Dort sind sie essentiell für dessen Entwicklung und regulieren Überleben, Tod oder Differenzierung von Neuronen während der embryonalen und postnatalen Phase (Levi-Montalcini et al., 1995; Lewin et al., 1996). Allerdings wurde auch ein Einfluss der Neurotrophine auf nichtneuronale Gewebe beschrieben. So übernehmen sie als Wachstums- und Überlebensfaktoren eine wichtige Funktion in der Aktivierung von nichtneuronalen Zellen, ihrer Proliferation und der Zellreparatur nach Zellschädigung (Nockher et al., 2005).

Neurotrophine werden in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und von diesen ausgeschüttet, wie in Abbildung 5 zu sehen ist. Zu diesen Zellen gehören neben Nervenzellen Entzündungszellen wie T- und B-Lymphozyten (Ehrhard et al., 1993), Mastzellen (Nilsson et al., 1997), Eosinophile (Solomon et al., 1998), Basophile, Neutrophile und Monozyten / Makrophagen (Ehrhard et al., 1993). Auch strukturelle Zellen wie Epithelzellen (Fox et al., 2001), Endothelzellen, glatte Muskelzellen (Freund et al., 2002) und Fibroblasten (Olgart et al., 2001) können Neurotrophine bilden.

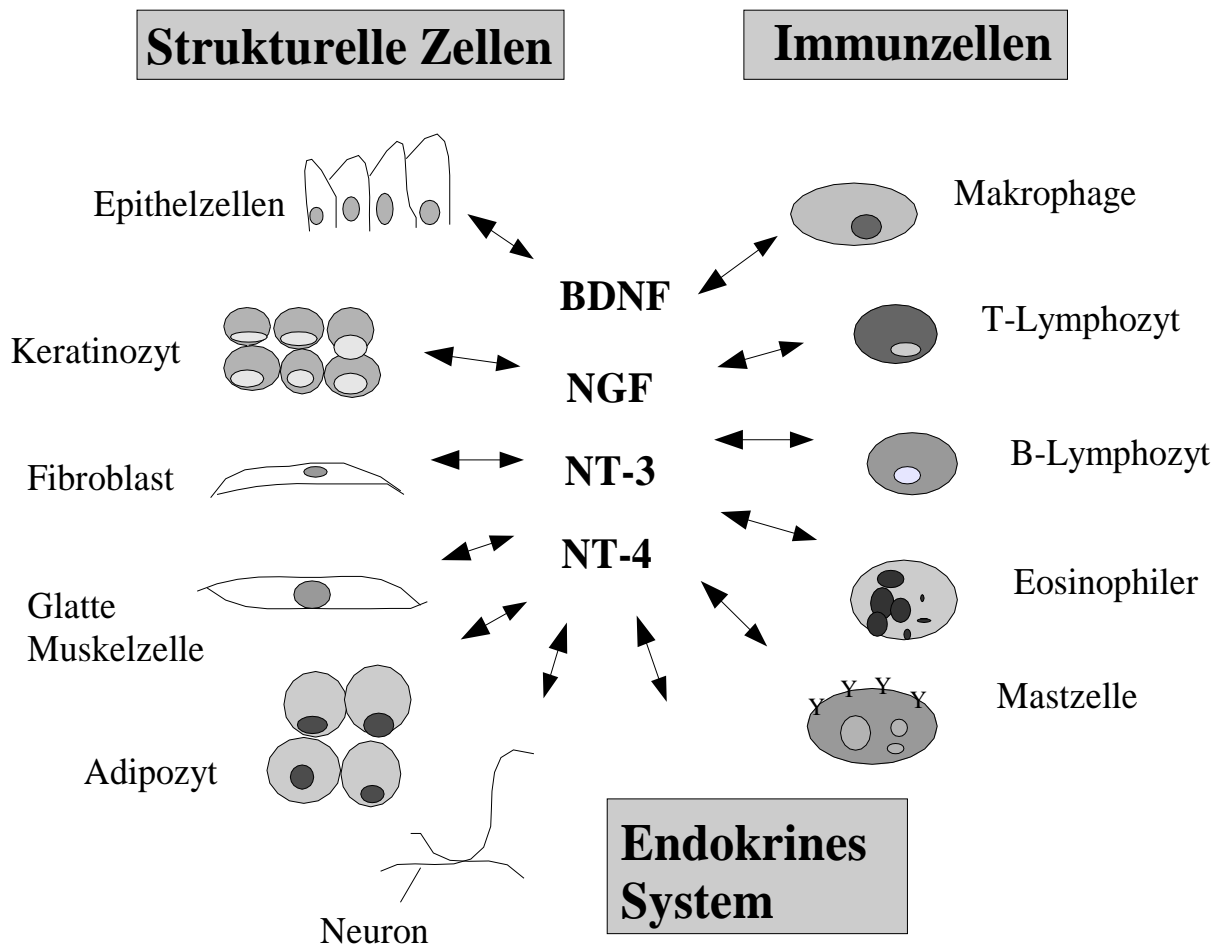


Abbildung 5: Bidirektionale Interaktion von Neurotrophinen und unterschiedlichen Körperzellen. Es findet sich eine gegenseitige Beeinflussung zwischen den vier verschiedenen Neurotrophinen und den unterschiedlichen Körperzellen wie Nervenzellen, Immunzellen und strukturellen Zellen. (Nach: Nockher, Renz: Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. Clinica Chimica Acta 2005, 352: 49-74)

Es gibt mindestens vier verschiedene Neurotrophine: BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Barde et al., 1987), NGF (nerve growth factor) (Levi-Montalcini et al., 1995), NT-3 (neurotrophin-3) (Hohn et al., 1990) und NT-4/5 (neurotrophin-4/5) (Hallbook et al., 1991). Sie stimmen in über 50 % ihrer Aminosäuresequenzen überein.

Alle Neurotrophine werden als Vorstufen mit einem Molekulargewicht von 31 - 35 kDa gebildet und proteolytisch in die biologisch aktive Form mit einem Molekulargewicht von 13 - 15 kDa aufgespaltet, die anschließend mittels nicht-kovalenter Bindung homodimerisieren (Nockher et al., 2003).

NGF z.B. ist ein komplexes Protein aus alpha-, beta- und gamma-Untereinheiten (Bax et al., 1993). Ausschließlich die beta-Einheit ist für die biologische Aktivität von

Bedeutung (Fahnestock et al., 1991). Zunächst wird ein Prä-Pro-NGF gebildet, welches in Pro-NGF und schließlich in das aktive NGF umgewandelt wird (Chao et al., 2002). Die biologischen Effekte der Neurotrophine hängen von dem jeweiligen Neurotrophinrezeptor ab. Alle Neurotrophine binden mit großer Affinität und Spezifität an Rezeptoren der Familie der Tyrosinkinassen (abgekürzt Trk A, B, C). Diese befinden sich auf der Oberfläche von Zellen des Nervensystems, auf strukturellen Zellen und auf anderen nichtneuronalen Zellen des Immunsystems und des endokrinen Systems. Wie Abbildung 6 zeigt, bindet NGF an Trk A, BDNF und NT-4/5 binden an Trk B und NT-3 bindet an Trk C (Wiesmann et al., 1999). Durch Bindung der Neurotrophine an den jeweiligen Rezeptor kommt es zur Dimerisierung der extrazellulären Domänen, die zu einer Aktivierung von Kinasen und Phosphorylierung im Zellinneren führt. Dies induziert G-Proteine wie Phospholipase C γ , Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase und Proteinkinase C. Über diese verschiedenen Transduktionswege wird schließlich die Transkription im Zellkern beeinflusst. Zellwachstum, Ausdifferenzierung und Überleben werden auf diese Weise gefördert, Apoptose dagegen verhindert. Es kommt zur Ausschüttung von Zellmediatoren und die Erregbarkeit von Nervenzellen wird erhöht (Kaplan et al., 1991).

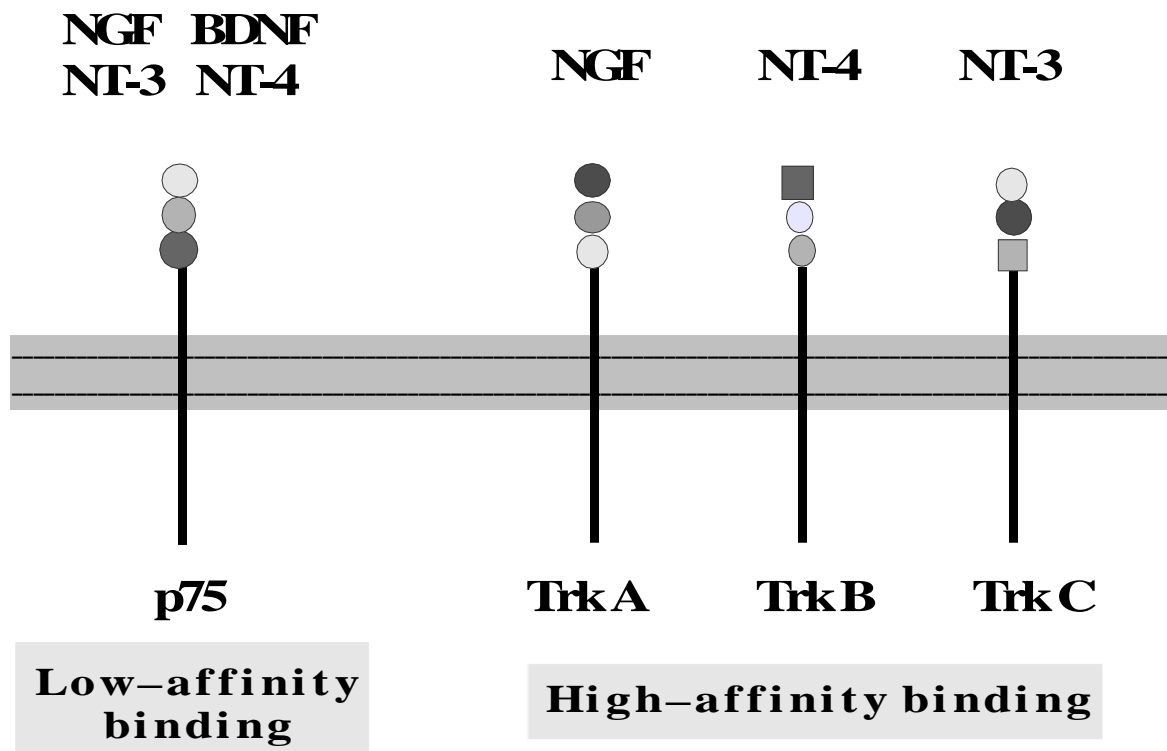


Abbildung 6: Neurotrophine und ihre Neurotrophinrezeptoren. Alle vier Neurotrophine binden an den niedrigaffinen Neurotrophin-Rezeptor p75. Ferner bindet NGF an den hochaffinen Neurotrophin-Rezeptor Trk A, BDNF und NT-4/5 binden an den hochaffinen Neurotrophin-Rezeptor Trk B und NT-3 bindet an den hochaffinen Neurotrophin-Rezeptor Trk C. (Nach: Nassenstein et al.: 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 2003, 198: 455-67)

Zusätzlich binden alle Neurotrophine mit geringerer Affinität an einen Rezeptor aus der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptorfamilie mit der Bezeichnung p75^{NTR} (Chapman et al., 1995). p75^{NTR} ist ein 75-kDa großes transmembranöses Glykoprotein (Hueber et al., 1986). Durch Bindung der Neurotrophine an den p75^{NTR} dimerisieren die extrazellulären Domänen und aktivieren so intrazelluläre Proteine wie Proteinkinase C und NF-κ B, die zu Überleben führen. Ferner zeigt Abbildung 7 aber auch einen weiteren Transduktionsweg, über den es zum Zelltod kommt (Chao et al., 2003).

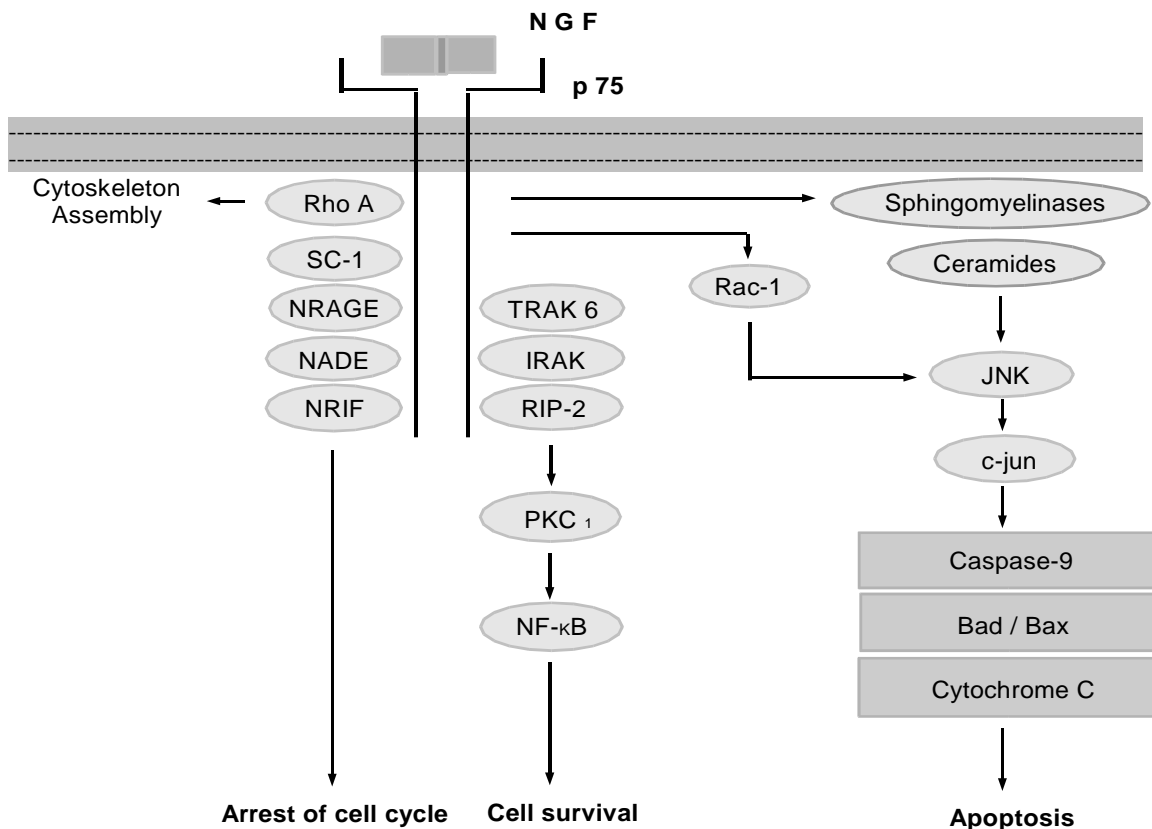


Abbildung 7: Die Signal-Transduktions-Kaskade des p75-Neurotrophinrezeptors. Bindet NGF an den Neurotrophinrezeptor p75, induziert es eine Signal-Transduktions-Kaskade, die über verschiedene second messenger zu unterschiedlichen Effekten wie Zellstillstand, Zellüberleben oder Apoptose führt. (Nach: Frossard et al.: NGF and its receptors in asthma and inflammation. European Journal of Pharmacology 2004, 500: 453-465)

Neurotrophine spielen nicht nur eine wichtige Rolle in neuronalem Wachstum und Überleben, sondern finden sich auch in erhöhter Konzentration bei Entzündungen. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen der Atemwege wie dem allergischen Asthma bronchiale werden erhöhte Werte der Neurotrophine in Serum und bronchoalveolärer Lavage gefunden (Bonini et al., 1996; Olgart-Höglund et al., 2002). Bereits kurze Zeit nach Allergenprovokation kommt es zum deutlichen Anstieg der Neurotrophin-Spiegel (Virchow et al., 1998). Neben der konstitutiven Neurotrophin-Synthese der strukturellen Zellen wie Epithelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten bilden in Entzündungsprozessen v.a. Entzündungszellen wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen Neurotrophine. Dabei beeinflussen die Neurotrophine das Nervensystem, was auch neuronale Plastizität genannt wird. Ihr Einfluss auf das Immunsystem wird als immunologische Plastizität bezeichnet.

Die immunologische Plastizität beschreibt die Veränderungen der immunologischen Eigenschaften, zu denen Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Überleben der immunologischen Zellen, Synthese und Sekretion ihrer Zytokine und ihre Sensibilisierung für aktivierende Reize gerechnet werden.

Dagegen ist die neuronale Plastizität durch sensorische Überempfindlichkeit (Hyperreaktivität) der sympathischen, parasympathischen und sensorischen Nervenzellen während entzündlicher Prozesse gekennzeichnet. Die Folge ist eine Induktion der Expression von Neuropeptiden und Neurotransmittern wie Substanz P, Neurokinine A und B und Acetylcholin. Diese bewirken Chemotaxis und Aktivierung von Entzündungszellen wie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Mastzellen, T- und B-Lymphozyten und Makrophagen, die in Folge die Schleimhaut der Bronchien infiltrieren. Ferner kommt es zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder TNF- α , die wiederum in die Entwicklung der T-Lymphozyten eingreifen und so auch den Isotypenwechsel von B-Lymphozyten zu IgE-produzierenden Plasmazellen veranlassen (Braun et al., 1999). Auch verstärken diese inflammatorischen Zytokine wie auch Transforming-Growth-Factor beta1 (TGF- β 1) die Expression und Sekretion von Neurotrophinen (Olgart et al., 2001). Diese haben wiederum Einfluss auf strukturelle Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen und aktivieren sie zu Migration und Kontraktion (Micera et al., 2001). Außerdem findet sich eine verstärkte Schleimproduktion, erhöhte Konstriktion der glatten Muskulatur in den Atemwegen, Atemwegsentzündung und Plasmaexudation, was zu Ödemen führt. Daraus resultiert eine Bronchokonstriktion und Atemflusslimitation, was die typischen klinischen

Symptome des Asthma bronchiale hervorruft (Nockher et al., 2003). Somit beeinflussen Neurotrophine als Wachstumsfaktoren die Neuropeptidsynthese und umgekehrt regulieren Neuropeptide und Neurotransmitter die Neurotrophinsynthese. Diese bidirektionale Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem wird als neurogene Entzündung bezeichnet (Renz et al., 2001).

Das komplexe Zusammenspiel zwischen Nervensystem und Immunsystem und die Rolle der Neurotrophine als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren darin ist trotz einiger weniger Erkenntnisse kaum verstanden und wird sicherlich in Zukunft mehr Aufmerksamkeit auf sich ziehen, da eine wichtige Rolle der Neurotrophine in chronisch entzündlichen Erkrankungen zu vermuten ist.

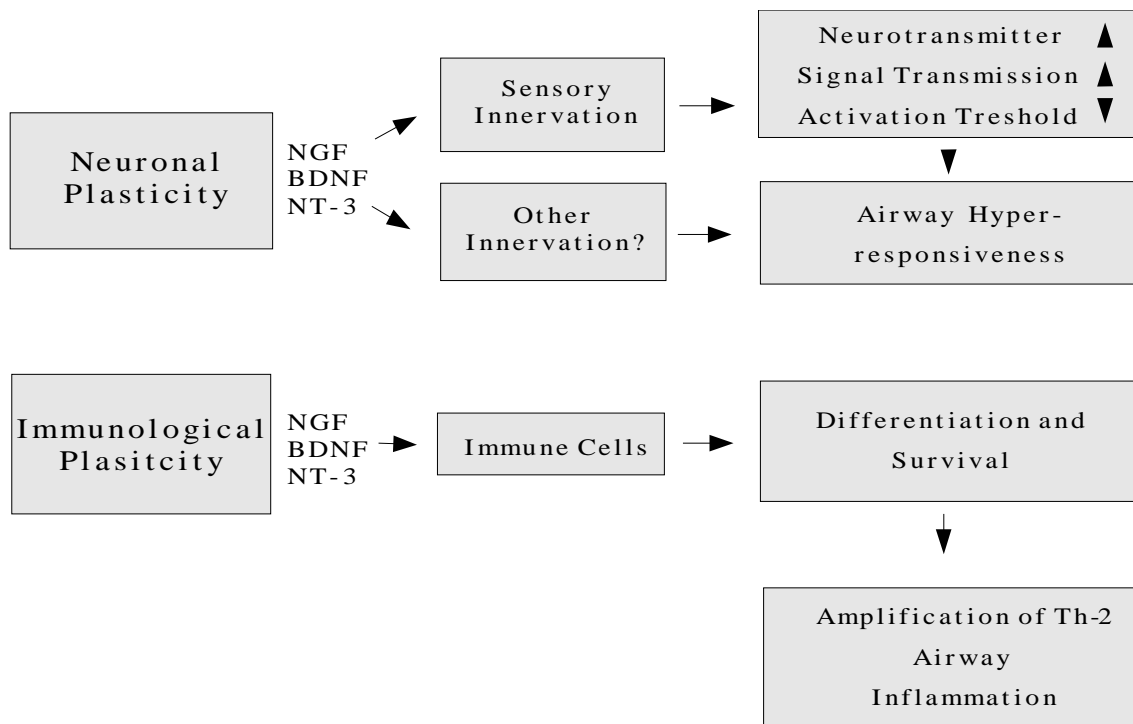


Abbildung 8: Neurotrophine modulieren die neuronale und immunologische Plastizität in allergischer Lungenentzündung. (Nach: Nockher, Renz: Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. Cytokine and Growth Factor Reviews 2003, 14: 559-578)

II. FRAGESTELLUNG

2.1 Fragestellung

Chronische Lungenerkrankungen wie das Asthma bronchiale sind schwere Erkrankungen mit steigender Prävalenz und daher von epidemiologischer Bedeutung. Durch funktionellen und strukturellen Umbau wird das Lungengewebe im Asthma bronchiale irreversibel geschädigt. Das Immunsystem und auch das Nervensystem sind in die Pathomechanismen dieser Erkrankung involviert. Beide interagieren miteinander über verschiedene Mediatoren, zu denen auch die Neurotrophine zählen. Neurotrophine spielen aber nicht nur eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Überleben von Neuronen, sondern sind auch bedeutend für die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von Immunzellen. Darüber hinaus scheinen sie auch Einfluss auf strukturelle Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten / Myofibroblasten zu haben.

Beim Asthma bronchiale finden sich vermehrt Fibroblasten und auch Myofibroblasten. Zusätzlich werden erhöhte Neurotrophin-Spiegel in den Atemwegen von Asthmatikern gemessen. Aus diesem Grunde beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss der Neurotrophine auf pulmonale Fibroblasten und Myofibroblasten und untersucht folgende Arbeitshypothesen bzw. Fragen:

- Wie unterscheiden sich Fibroblasten und Myofibroblasten im Hinblick auf ihre Neurotrophin- und Neurotrophinrezeptor-Expression?
- Lassen sich Unterschiede im Stoffwechsel von Fibroblasten und Myofibroblasten feststellen und nehmen Neurotrophine am Stoffwechsel teil?
- Gibt es Unterschiede in der Proliferation zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten und sind Neurotrophine daran beteiligt?
- Fibroblasten und Myofibroblasten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morphologie. Haben Neurotrophine Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten?

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Fibroblasten-Linie

MLg-Zellen = MLg 2908 (Promochem)

Fibroblasten aus der Lunge einer Maus (Mus musculus)

Geliefert im gefrorenen Zustand in einer Ampulle mit 1 ml Zellen

3.1.2 Auftauen gefrorener Fibroblasten

Die Ampulle mit den gefrorenen Zelllinien der Fibroblasten wurde im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Die Zelllinien wurden im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und die Ampulle anschließend zur Desinfektion in 70 % Ethanol getaucht. Unter sterilen Bedingungen wurde die Zellsuspension in eine T-25-Flasche mit Medium überführt und im Brutschrank unter optimalen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Medium

Earle´s MEM (minimal essential medium) (PAA) + 10 % FCS (heat-inactivated fetal calf serum) + 1 % NaPyruvat + 1 % NEAA + 1 % HEPES + 1 % Glutamat + 1 % PenStrep

Gefriermedium

Kulturmedium 95 % + DMSO (Dimethylsulphoxid) 5 %

3.1.3 Isolierung von primären Fibroblasten aus der Lunge

Mäuse vom Stamm FVBN wurden 30 min vor der Präparation mit 50-100 µl Heparin i.p. heparinisiert. Anschließend wurden die Mäuse mit Ketamin / Rompun betäubt und bluteten aus. Eine BronchoAlveolarLavage mit 3 maligem Spülen der Lungen mit PBS wurde durchgeführt. Danach folgten die Entfernung der Lungen und ihre Aufnahme in PBS. Mit einer Rasierklinge wurden die Lungen in kleine Stücke geschnitten und in 30 ml 0,5 % Trypsin / EDTA aufgenommen. Die im Trypsin / EDTA gelösten Zellen wurden 30 min lang bei 37 °C im Bakterienschüttler gerührt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit einem Sieb filtriert und auf 50 ml mit PBS oder Medium aufgefüllt. Nun zentrifugierte man die Zellsuspension bei 300 g 5 min lang. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und wieder 5 min bei 300 g zentrifugiert. Die Überstände wurden nochmals verworfen, die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine T-25-Flasche mit Filterdeckel überführt. Es folgte die Inkubation der Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ über Nacht.

Medium

DMEM high Glucose PAA + 10 % FCS + 1 % HEPES + 1 % Glutamin + 1 % PenStrep / Antimykotika + 1 % NEAA

PBS (Biochrom AG)

Dulbecco, instamed 9,55 g / l, w / o Ca²⁺, Mg²⁺

3.1.4 Kultivierung von Fibroblasten

Adhärente Fibroblasten wurden unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 5 % CO₂ und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Sobald der Boden einer T-75-Flasche konfluent war (dies wurde unter dem Mikroskop festgestellt), wurden die Zellen 1:3 umgesetzt. Hierzu kippte man den Überstand weg und spülte die adhärenen Zellen mit 25 ml PBS.

Anschließend gab man 6 ml Trypsin hinzu, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Sobald die Zellen in der Lösung schwammen, wurden 10 ml Vollmedium hinzugegeben, um das Trypsin zu stoppen. Die gelösten Zellen wurde dann in zwei 15 ml-Tubes umgefüllt und bei 209 g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde weggekippt und das Zentrifugat in 10 ml Medium aufgelöst. Aus diesen Lösungen wurden dann jeweils 3,3 ml Zellen in neue T-75-Flaschen überführt, in die zuvor 25 ml Vollmedium pipettiert wurden. Im Anschluss wurden die Flaschen im Brutschrank inkubiert.

Vollmedium

Earle´s MEM (PAA) + 10 % FCS + 1 % HEPES + 1 % NEAA + 1 % NaPyruvat
+ 1 % Glutamat + 1 % PenStrep

3.1.5 Stimulation von Fibroblasten mit TGF-β1

In einer konfluenten T-75-Flasche wurden Fibroblasten wie oben beschrieben aufgelöst. Zwei 12-well-Platten wurden mit jeweils 2 ml in Medium gelösten Zellen / well benetzt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag tauschte man 2 ml Vollmedium gegen 2 ml Ersatzmedium aus. Die Zellen wurden nochmals über Nacht inkubiert.

Am 3. Tag wurden die Zellen einer der beiden 12-well-Platten mit TGF-β1 stimuliert. Für die Stimulation wurde Ersatzmedium mit Zugabe von TGF-β1 in einer Konzentration von 20 ng / ml angesetzt. Anschließend wurden jeweils 2 ml Ersatzmedium gegen 1 ml Ersatzmedium + TGF-β1 ausgewechselt. Die andere 12-well-Platte wurde nicht stimuliert und diente als Kontrollgruppe. Hierbei wurden lediglich 2 ml Ersatzmedium gegen 1 ml Ersatzmedium ausgetauscht.

Am 4., 5., 6. und 7. Tag- also nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellüberstände für die nachfolgenden ELISA´s abgenommen. Die Zellen hingegen wurden in je 350 µl RLT-Puffer / well aufgelöst und ihre DNA und RNA für die später durchzuführenden PCR´s tiefgefroren.

Ersatzmedium

Earle's MEM (PAA) + 10 % Panexin + 1 % HEPES + 1 % NEAA + 1 %
Glutamat + 1 % NaPyruvat + 1 % PenStrep

TGF-β1 (PEPROTECH EC)

Recombinant Human Transforming Growth Factor-beta 1 aus BTI-Tn-5B1-4
High-5 Insect cells

3.1.6 CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay

Der CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay beinhaltet eine fluorometrische Methode, mit der man lebende Zellen bzw. ihren Stoffwechsel auf 96-well-Platten messen kann. Der Test bedient sich des Indikators Resazurin, der von lebenden Zellen zu Resorufin verstoffwechselt / reduziert und so fluoreszent und messbar wird. Tote Zellen dagegen verlieren schnell ihre Fähigkeit, zu reduzieren, können folglich Resazurin nicht verstoffwechseln und erzeugen somit kein fluoreszierendes Signal. Ihre Fluoreszenz kann nicht bei 544 und 612nm gemessen werden.

Es wurden Messungen an 5 verschiedenen Gruppen unternommen: a) Medium (auch Medium allein hat die Eigenschaft, in geringem Maße zu fluoreszieren), b) Kontrollgruppe mit unstimulierten Fibroblasten, c) durch Anti-Neurotrophine inhibierte Fibroblasten, d) durch TGF-β1 stimulierte Fibroblasten, die sich zu Myofibroblasten differenzierten, und e) durch Anti-Neurotrophine inhibierte Myofibroblasten. Zur Herstellung der Messgruppen wurden die sich in Lösung befindlichen Zellen im Zellzählgerät ausgezählt und so verdünnt, dass man eine Ausgangskonzentration von 4×10^5 Zellen / ml erhielt. Anschließend wurden Verdünnungsreihen von 1:1, 1:10 und 1:100 vorbereitet. Auf einer schwarzen 96-well-Platte wurden die Zellproben zu je 100 µl / well wie folgt auf die 8 horizontalen Reihen aufgetragen: Die obersten wells enthielten nur Vollmedium. In die wells der 3. Reihe pipettierte man die Kontrollgruppe mit den Fibroblasten in der jeweiligen Verdünnungsreihe, beginnend mit der Konz. 400.000 Zellen / ml. Eine Reihe darunter (4. Reihe) wurden die mit Anti-Neurotrophinen inhibierten Fibroblasten aufgetragen. Schließlich befanden sich in den

wells der 6. Reihe die Myofibroblasten der jeweiligen Verdünnungsreihe, wieder beginnend mit der Konz. 400.000 Zellen / ml. Und zum Schluss wurden in die 7. Reihe die durch Anti-Neurotrophine inhibierten Myofibroblasten pipettiert. Die 96-well-Platte wurde über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag waren die Zellen adhärent. Das jeweilige Medium wurde gegen Ersatzmedium + Panexin ausgetauscht. Das Medium der Zellen, die mit Anti-Neurotrophinen inhibiert werden sollten, enthielt zusätzlich die beiden Anti-Neurotrophine anti-BDNF mit der Konz. 625 ng / ml und anti-NGF mit der Konz. 500 ng / ml. Die wells der beiden unteren Reihen mit den Zellen, die mit TGF- β 1 stimuliert werden sollten, wurden durch Ersatzmedium + Panexin + TGF- β 1 in der Konz. 20 ng / ml ausgewechselt. Wieder inkubierten die Zellen über Nacht.

Am nächsten Tag (nach 24 h) wurden pro well 20 μ l CellTiter-Blue Reagenz pipettiert. Die 96-well-Platte wurde kurz geschüttelt und für 1-4 h im Brutschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte im PC.

Die gleiche Versuchsanordnung wiederholte man auch mit Inkubationszeiten von 48 h, 72 h und 96 h.

CellTiter-BlueTM Reagenz (Promega)

Resazurin

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Neurotrophin-ELISA

ELISA-Platten wurden mit 100 μ l Primär-Antikörper über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 200 μ l Block and Sample-Puffer aufgetragen und 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Standardverdünnungsreihe vorbereitet und die Proben aufgetaut und 1:10 verdünnt. Nach einmaligem Waschen wurden je 100 μ l Standardreihe, unverdünnte sowie 1:10 verdünnte Proben auf die Platten aufgetragen und 6 h bei RT inkubiert. Nach

fünfmaligem Waschen erfolgte das Auftragen von 100 µl Sekundär-Antikörper. Die ELISA-Platten wurden dann bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte die Detektion mit je 100 µl HRP-Konjugat und die Platten wurden 2,5 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde 100 µl TMB-Substrat aufgetragen. Die ELISA-Platten wurden 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Mikrotiter-PC gemessen.

Beschichtungslösung

0,025 M Carbonat + 0,025 M Bicarbonat

Waschpuffer

150 mM NaCl + 20 mM Tris + 0,05 % Tween 20 (mit HCl auf pH 7,6 eingestellt)

Stopplösung

H₂SO₄

Substratlösung (Emax Immunoassay System)

TMB One Solution

In diesen 4 Versuchskomponenten glichen sich die Neurotrophin-ELISA's für BDNF, NGF, NT-3 und NT-4. Allerdings unterschieden sich die ELISA's in den jeweiligen Antikörpern, Standards und Detektionslösungen. Diese sind im Folgenden aufgelistet.

3.2.1.1 BDNF-ELISA

Antikörper (Emax ImmunoAssay System)

Anti-BDNF mAb

Anti-Human BDNF pAb

Standard (Emax ImmunoAssay System)

BDNF Standard

Detektionslösung (Emax ImmunoAssay System)

Anti-IgY HRP Conjugate

3.2.1.2 NGF-ELISA

Antikörper (Emax Immunoassay System)

Anti-NGF pAb

Anti-NGF mAb

Standard (Emax Immunoassay System)

NGF Standard

Detektionslösung (Emax Immunoassay System)

Anti-Rat IgG, HRP Conjugate

3.2.1.3 NT-3-ELISA

Antikörper (Emax Immunoassay System)

Anti-Human NT-3 pAb

Anti-NT-3 mAb

Standard (Emax Immunoassay System)

NT-3 Standard

Detektionslösung (Emax Immunoassay System)

Anti-Mouse IgG, HRP Conjugate

3.2.1.4 NT-4-ELISA

Antikörper (Emax Immunoassay System)

Anti-Human NT-4 pAb

Anti-NT-4 mAb

Standard (Emax Immunoassay System)

NT-4 Standard

Detektionslösung (Emax Immunoassay System)

Anti-Mouse IgG, HRP Conjugate

3.2.2 Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)

Mit dem Zellproliferations-ELISA kann man das Zellwachstum mittels Immunfluoreszenz messen. Dieses Verfahren beruht auf der Detektion von BrdU, welches während der Zellproliferation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird.

Zellen wurden ausgezählt und 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Je 100 µl der jeweiligen Proben wurden auf die schwarzen ELISA-Platten aufgetragen und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Die Überstände wurden weggekippt und je 100 µl Ersatzmedium auf die angehefteten Zellen gegeben. Die Platten wurden 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen stimuliert bzw. inhibiert durch Mediumwechsel zu Ersatzmedium und TGF-β1 (Konzentration 20 ng / ml) und anti-NT's (Konzentration anti-BDNF 625 ng / ml, anti-NGF 500 ng / ml) und Mischungen untereinander. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank erfolgte das Auftragen von 10 µl BrdU pro well. Die ELISA-Platten inkubierten 12 h bei 37 °C im Brutschrank. Das Medium wurde abgekippt und 200 µl FixDenat-Lösung pro well zum Fixieren der Zellen aufgetragen. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde das FixDenat weggeschüttet und 100 µl Anti-

BrdU-Antikörper pro well aufgetragen. Nach 90 min Inkubation bei RT wurde dreimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mit je 100 µl Substrat. Die Platten inkubierten 5 min und anschließend wurde die Lumineszenz im Luminometer gemessen.

anti-NGF

Anti-Human β -NGF (PEPROTECH EC)

anti-BDNF

Anti-Human BDNF (PEPROTECH EC)

BrdU-Lösung

BrdU labeling solution (= 100 µM BrdU)

Fixierungslösung

FixDenat

Antikörper

Anti-BrdU-POD stock solution in antibody dilution solution

Waschlösung

Washing buffer concentrate

Detektionslösung

Substrate component A + Substrate component B

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Gewinnung mittels RNeasy Mini Kit

Qiagen

Um Genprodukte nachweisen zu können, musste man die entsprechende DNA und RNA gewinnen. Die lysierten Zellen beinhalteten aber außer der DNA und RNA auch noch andere Zellbestandteile wie Zellmembranen, Zellorganellen etc.. Deshalb mussten diese entfernt werden, um die DNA und RNA extrahieren zu können.

Dazu wurde der Arbeitsplatz mit RNase Erase abgewischt und RNA-freie Handschuhe wurden angezogen. Die tiefgefrorenen Proben- je 350 µl lysierte Zellen in RLT-Puffer + Mercapto-Ethanol- wurden aufgetaut und auf Eis gestellt. Je 1 Volumen (= 350 µl) Ethanol wurde in die Tubes pipettiert. Das gesamte Gemisch (= 700 µl) wurde auf RNeasy-Säulen pipettiert. Anschließend wurden die Tubes 15 sec bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säulen wieder auf neue Collection-Tubes umgesetzt. 700 µl RW1-Puffer wurden auf die Säulen pipettiert und die Tubes 15 sec bei 10 000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Durchlauf verworfen und die Säulen auf neue Collection-Tubes umgesetzt. Nun wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und die Tubes 15 sec bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und es kamen nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen. Die Tubes wurden nun 2 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden auf neue Cups umgesetzt und 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen auf sterile 1,5 ml-Eppendorfgefäße umgesetzt, mit 30 µl sterilem Wasser gespült und 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Aus dem Sammelcup wurde der Durchlauf noch einmal auf die Säulen pipettiert und 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert.

Danach wurde die RNA-Konzentration im Gen Quant II gemessen und die Proben wieder auf Eis gestellt.

Puffer (Qiagen)

Puffer RLT

Puffer RW1

Puffer RPE

3.3.2 DNA-Verdau mit DNA-freeTM von Ambion

Da für die anschließende Reverse Transkription reine RNA gebraucht wurde, in den Proben aber auch noch die DNA enthalten war, musste die DNA vorher noch entfernt werden und zwar mit DNA-freeTM.

Jeweils 25 µl der Proben wurden in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert, mit je 2,5 µl DNase-Puffer und je 1 µl DNase versetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Pro Eppendorfgefäß wurden 5 µl DNase-Inaktivator hinzugegeben. Der Probenansatz wurde 2 min bei RT inkubiert und anschließend 2 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert und auf Eis gestellt.

Puffer (Ambion)

10 x DNase I Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂)

DNase (Ambion)

rDNase I (2 units / µl)

DNase-Inaktivator (Ambion)

DNase Inactivation Reagent

3.3.3 Reverse Transkription und –RT mit SuperscriptTM II

Nun da die DNA zerstört worden war und nur noch die reine RNA vorlag, konnte diese in die DNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit der SuperscriptTM II.

Je 5 µl Probe wurden in 0,5 ml-Eppendorfgefäße pipettiert. Zu diesen wurden je 0,5 µl Random Primer und 0,5 µl dNTP's hinzugefügt. Die Probenansätze wurden 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend bei 5000 rpm zentrifugiert. Danach pipettierte man zu den Proben je 2 µl 5 x Strand-Puffer + 1 µl DTT + 0,5 µl RNase Out + 1 µl Superscript II. Dies war der Ansatz für die Reverse Transkription, für die –RT änderte sich der

Ansatz nur durch Weglassen der Superscript und stattdessen 1 µl Wasser. Die Proben wurden dann im Biometra-PC nach folgendem Schema inkubiert: 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C. Daraufhin wurden die cDNA-Proben 1:10 verdünnt und auf Eis gestellt, die unverdünnten Proben wurden für weitere Versuche bei -20 °C tiefgefroren.

Random Primer (Invitrogen)

Random Primer Oligonukleotide (Hexamere) 0,09 OD₂₆₀ units / µl in 3 mM Tris-HCl pH 7,0, 0,2 mM EDTA

dNTP's (2'- Desoxynukleosid – 5'- Triphosphat) (Invitrogen)

10 mM dNTP-Mix aus allen 4 Nukleotiden (dATP's, dCTP's, dGTP's, dTTP's) in 0,6 mM Tris-HCl pH 7,5

Reverse Transcriptase (Invitrogen)

SuperScript™II Reverse Transcriptase (200 units/µl) im Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 0,01 % NP 40, 0,1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 50 % Glycerol)

5 x Strand-Puffer (Invitrogen)

5 x Reaction-Puffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

DTT (Invitrogen)

0,1 M DTT

Ribonuklease-Inhibitor (Invitrogen)

RNaseOut™

3.3.4 REDTaq™ Ready Mix-PCR

Da man endlich die cDNA erhalten hatte, wurde diese durch die PCR vervielfältigt. Dies geschah mit dem REDTaq™ Ready Mix bestehend aus einem PCR-Puffer, MgCl₂, Polymerase und dNTP's. Zu je 10 µl dieses REDTaq™ Ready Mix' wurden je 1µl der entsprechenden Primer für Neurotrophine oder Neurotrophinrezeptoren, 7 µl Wasser und 2 µl der jeweiligen Proben hinzugefügt. Der Probenansatz wurde dann im Robocycler für 1,5 h mit 45 Zyklen nach folgendem Schema inkubiert: 95 °C 30 sec, 58°C 45 sec, 72 °C 30 sec. Anschließend wurden die DNA-Proben bei 4-6 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

REDTaq™ ReadyMix (Sigma)

1,5 units Taq DNA-Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001 % Gelatine, 0,2 mM dNTP's, Stabilisator

Primer und –sequenzen (Metabion)

BDNF : forward : 5'-AGG ACG CGG ACT TGT ACA CT-3'
reverse : 5'- TCA GTT GGC CTT TGG ATA CC-3'

NGF : forward : 5'-GGC AGC TTT TTG GAA ACT CC-3'
reverse : 5'-ACG ACC ACA GGC CAA AAC T-3'

NT-3 : forward : 5'-CTG AGT GAC AGC ACC CCT TT-3'
reverse : 5'-CAG CAC TGT GAC CTG GTG TC-3'

NT-4/5 : forward : 5'-TCC CCT GCG TCA GTA CTT CT-3'
reverse : 5'-TTC CAT TCT GAG AGC CAG TG-3'

Trk A : forward : 5'-AGG TCT TTC TCG CTG AGT GC-3'
reverse : 5'-GGT GCA GAC TCC AAA GAA GC-3'

Trk B : forward : 5'-CGA ACC TGC AGA TAC CCA AT-3'
reverse : 5'-TCA TGT GCT TGG AAA CCA AA-3'

Trk C : forward : 5'-GAA GGA GAC AAT GCC GTG AT-3'
reverse : 5'-TGG CAT GTA CAT TGG TCC AG-3'

p75 : forward : 5'-TTC TAG GGG TGT CCT TTG GA-3'
reverse : 5'-TCA CCA CGT CAG AGA ACG TA-3'

Synthesis Scale 0,02 μ mol, entsalzt Delivery Form : Conc. 100 pmol / μ l

3.3.5 DNA-Gel

Mittels Gelelektrophorese kann man verschieden lange DNA-Stücke auftrennen. Um eine Gelelektrophorese durchführen zu können, musste ein DNA-Gel gegossen werden. Dazu wurden 1-2 g Agarose in einem 200 ml-Erlenmeyerkolben abgewogen und mit 100 ml TBE-Puffer vermischt. Die flüssige Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Unter dem Abzug wurden 3 μ l Ethidiumbromid zur Lösung dazugegeben und vermischt. Nun wurde die Lösung in eine Gelform gegossen, die sich in einem Schlitten mit Probenkämmen befand. Das Gel härtete anschließend ca. 20 min aus.

TBE-Puffer (Roth)

Agarose GTO, 108 g Tris Base + 50 g Boric Acid + 40 ml EDTA pH 8,0

3.3.6 Gelelektrophorese und Gelauswertung

Das fest gewordene Gel wurde aus dem Schlitten genommen und in die Stromkammer mit TBE-Puffer hineingelegt. Die Kämmen wurden herausgezogen und die Proben in die Taschen pipettiert. Am Anfang einer jeden Probenreihe wurde zum Vergleich ein DNA-Marker mit 100 bp pipettiert. Anschließend wurde die Kammer angeschlossen

(Spannung 100 V und Strom 30 A) und lief ca. 1 h. Nach abgelaufener Zeit wurde das Gel mit den aufgetragenen Proben aus der Kammer genommen und in die Gel-Dokumentation hineingelegt. Das Bild wurde scharf gestellt und ein Bild von den aufgetrennten Proben gemacht. Dann folgte die Beschriftung der Proben auf dem Foto.

Marker (Peqlab)

100 Basenpaare in Konz. 0,5 mg DNA / ml im Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin, 50 mM EDTA)

3.4 Histologie

3.4.1 Ansetzen der Zellen

Fibroblasten wurden ausgezählt und verdünnt. Je 1,5 bis 2 ml in Lösung befindliche Fibroblasten wurden in chamber slides ausgesät und über Nacht inkubiert. Das Vollmedium wurde durch Ersatzmedium + Panexin ausgetauscht. Jeweils eines der chamber slides Kästchen blieb unstimuliert, ein anderes wurde mit TGF- β 1 und ein drittes mit TGF- β 1 und gleichzeitig mit Anti-Neurotrophinen stimuliert– zum Vergleich der unterschiedlichen Morphologie zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten und zur Beobachtung des Einflusses der Neurotrophine auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Die Zellen wurden 48 h inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt.

3.4.2 Fixierung und HE-Färbung

Die chamber slides wurden für 30 min zur Fixierung der Zellen in Formalin getaucht. Anschließend wurden die chambers von den Platten abgetrennt und mit Wasser

gewaschen. Die Platten wurden für 8 min in Hämatoxilin getaucht und dann 10 min lang mit warmem Wasser gespült. Nun tauchte man die Platten für 5 min in Eosin. Es folgte das Eintauchen der Platten in destilliertes Wasser und anschließend in eine aufsteigende Alkoholreihe. Zum Schluss wurden die Platten in Xylol getaucht und eingedeckt.

3.5 Statistik

3.5.1 Statistik

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung von GraphPad Prism durchgeführt. Mittels unpaaren t-Test wurde die statistische Signifikanz für normalverteilte Daten untersucht. Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Sämtliche Werte sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung angegeben.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1 Gesteigerte Neurotrophin-Produktion der Myofibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten

4.1.1 Neurotrophin-RNA-Expression

Zunächst interessierte, ob Fibroblasten und Myofibroblasten überhaupt Neurotrophine produzierten. Dazu wurden zwei Zellreihen angesetzt. Die Fibroblastengruppe wurde von unstimulierten Fibroblasten gebildet. Zusätzlich wurden weitere Fibroblasten mit TGF- β 1 der Konzentration 20 ng / ml stimuliert und differenzierten sich dadurch zu Myofibroblasten. Nachdem die Überstände von Fibroblasten und Myofibroblasten für die nachfolgenden ELISA's abgenommen worden waren, lysierte man die Zellen und gewann ihre RNA für die sich anschließenden PCR's. Diese RNA wurde auf die Neurotrophin-Expression untersucht.

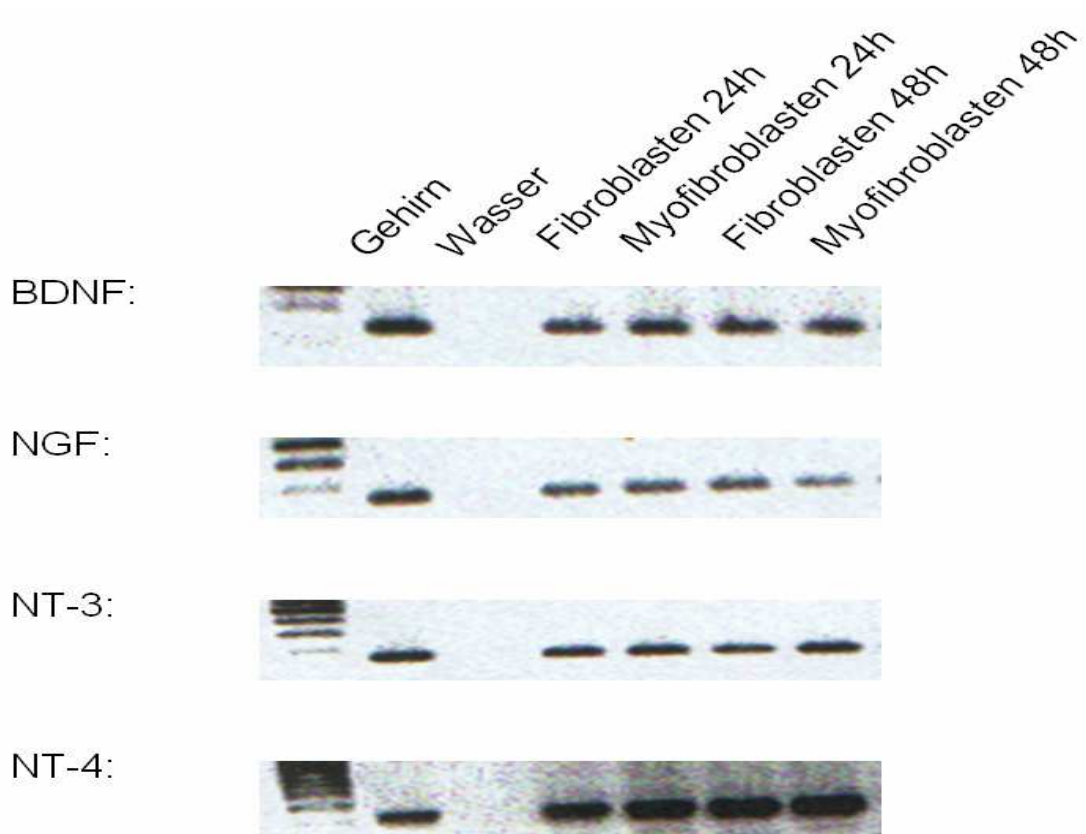


Abbildung 9: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophin-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten. Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der Neurotrophin-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten nach 24 und 48 Stunden. Nebenbei ist jeweils eine Positiv- und Negativprobe dargestellt. n=3

Die Abbildung zeigt Photographien der verschiedenen PCR-Produkte. Es sind die jeweilige Neurotrophin-DNA's abgelichtet. Aufgetragen sind Proben von Fibroblasten und Myofibroblasten nach 24 h und 48 h. Außerdem wurde ZNS-Gewebe als Positivkontrolle und Wasser als Negativkontrolle aufgetragen.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten RNA für die vier Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 synthetisierten.

Analoge Versuche wurden mit den primären Fibroblasten und Myofibroblasten unternommen. Die PCR's ergaben die gleichen Ergebnisse wie oben bei den Fibroblasten zu sehen ist: Sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten exprimierten nach 24 h und 48 h die RNA für die entsprechenden Neurotrophine.

4.1.2.1 Gesteigerte Neurotrophin-Produktion der Myofibroblasten

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten die RNA für die jeweiligen Neurotrophine exprimierten, interessierte, in welchen Mengen die jeweiligen Neurotrophine produziert wurden. Hierzu wurden die Überstände von Fibroblasten und Myofibroblasten, die nach bestimmten Zeitintervallen (nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) abgenommen worden waren, mittels ELISA auf die Neurotrophin-Produktion von BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 untersucht.

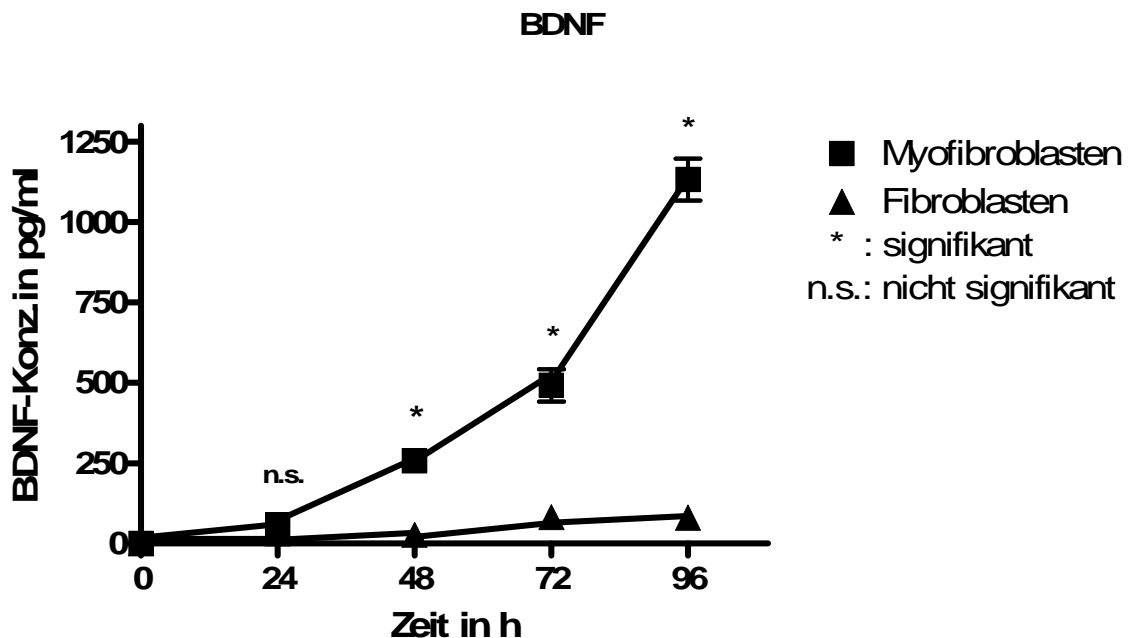


Abbildung 10: BDNF-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen. Die Konzentrationen von BDNF in Fibroblasten und Myofibroblasten wurden nach bestimmten Zeitintervallen mittels ELISA gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=4) +/- Standardabweichung angegeben.

Aufgetragen sind die verschiedenen BDNF-Konzentrationen der Fibroblastengruppe und der durch TGF- β 1-stimulierten Myofibroblastengruppe in Abhängigkeit von der Zeit. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, dass Myofibroblasten größere Mengen an BDNF exprimierten als Fibroblasten. Ein signifikanter Unterschied war aber erst nach 48 h erkennbar. In der Fibroblastengruppe stiegen die BDNF-Konzentrationen nicht wesentlich an. Sie erreichten bereits nach 72 h ein Plateau mit einem maximalen Wert

von 82 +/- 13 pg / ml. Dagegen war ein starker Anstieg der BDNF-Konzentrationen unter den Myofibroblasten zu verzeichnen. Der maximale Wert ergab 1133 +/- 65 pg / ml nach 96 h.

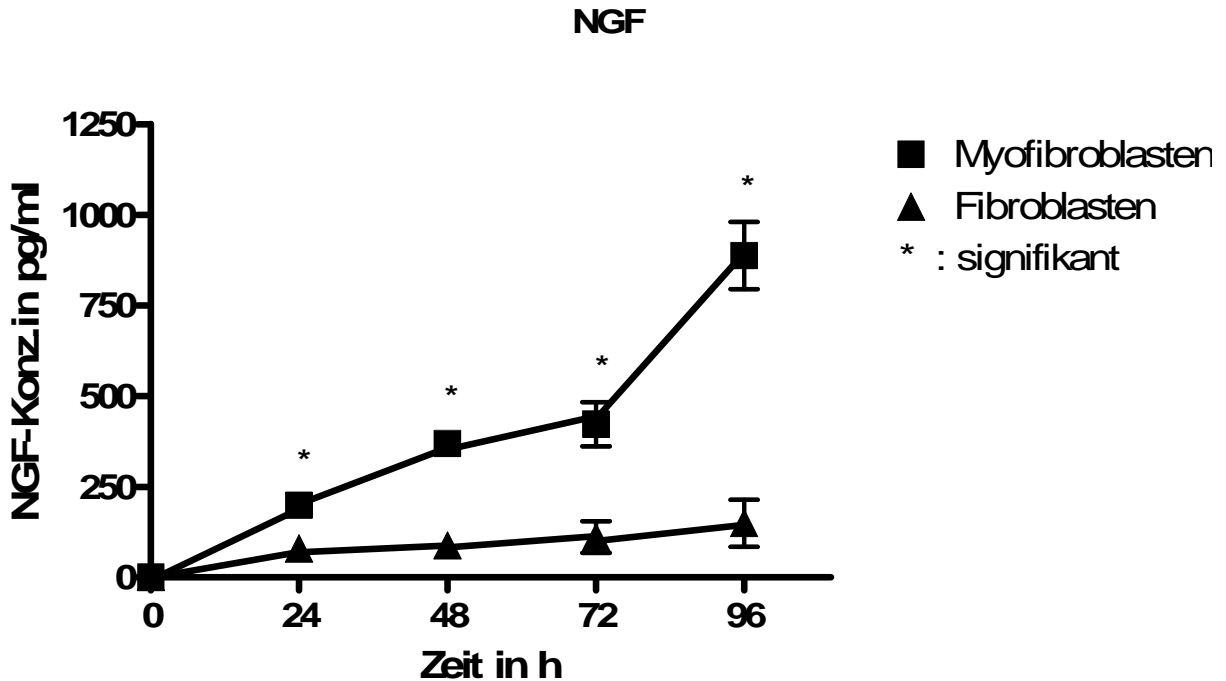


Abbildung 11: NGF-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen. Die Konzentrationen von NGF in Fibroblasten und Myofibroblasten wurde nach bestimmten Zeitintervallen mittels ELISA gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=6) +/- Standardabweichung angegeben.

Für die NGF-Expression fand sich ein ähnliches Bild wie für die BDNF-Expression. In der Fibroblastengruppe beobachtete man einen langsamen Anstieg der NGF-Expression mit einem maximalen Wert von 149 +/- 65 pg / ml nach 96 h. Indessen zeigte sich wieder ein deutlich stärkerer Anstieg der Neurotrophin-Konzentration in der Myofibroblastengruppe. Hier wurde der höchste NGF-Wert mit 890 +/- 93 pg / ml nach 96 h gemessen. Zu allen Zeiten waren die Unterschiede in den NGF-Konzentrationen zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten signifikant.

NT-3

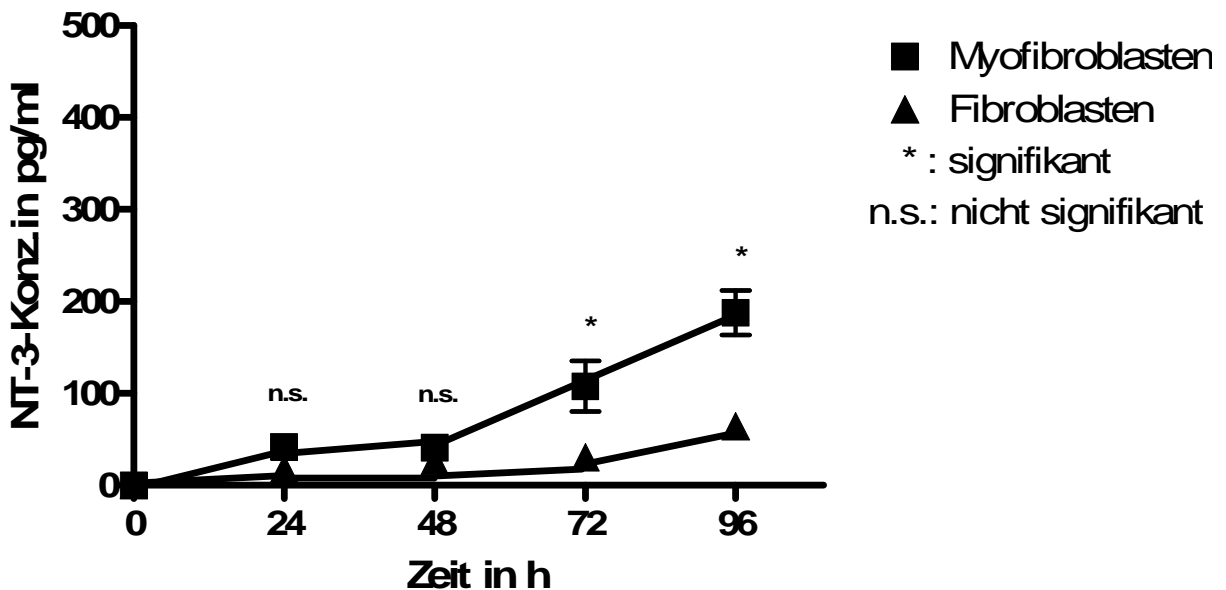


Abbildung 12: NT-3-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von NT-3 in Fibroblasten und Myofibroblasten gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=7) +/- Standardabweichung angegeben.

Bei den NT-3-Konzentrationen sind im Allgemeinen geringere Konzentrationen gemessen worden. Aber auch hier fand man eine höhere NT-3-Expression in der Gruppe der Myofibroblasten als in der Fibroblastengruppe. Die Konzentrationen waren v.a. in den ersten 48 h ziemlich klein und auch nicht deutlich verschieden zwischen Myofibroblasten und Fibroblasten. Erst nach 72 h beobachtete man signifikante Unterschiede. Nach 96 h erhielt man in der Fibroblastengruppe eine maximale NT-3-Konzentration von 64 +/- 10 pg / ml und einen höchsten Wert von 188 +/- 24 pg / ml unter den Myofibroblasten.

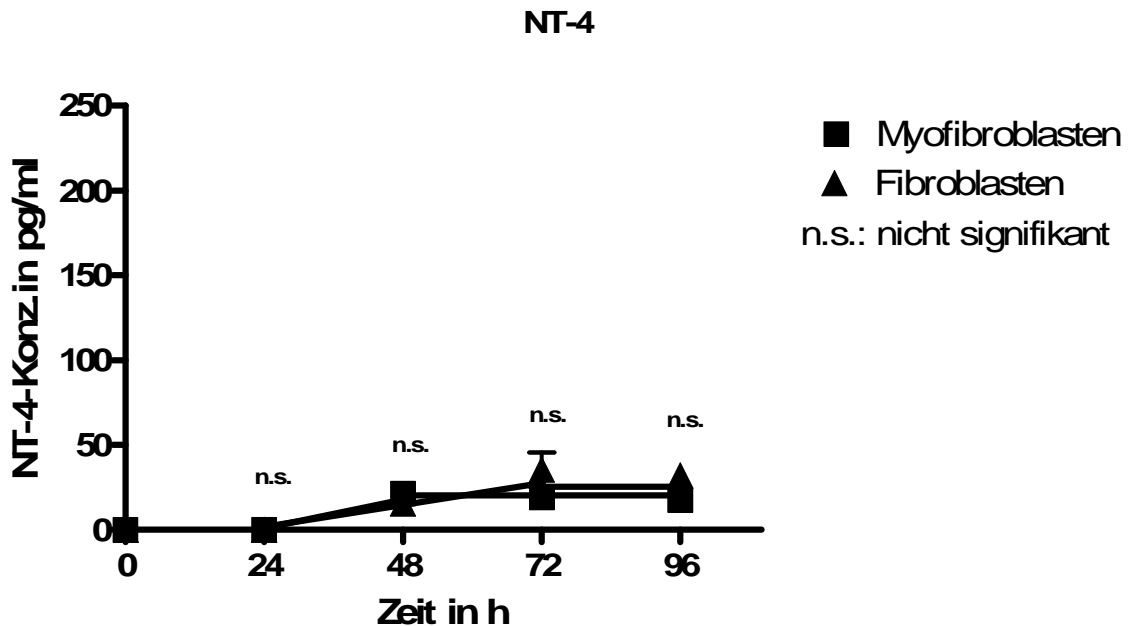


Abbildung 13: NT-4/5-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von NT-4/5 in Fibroblasten und Myofibroblasten gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=3) +/- Standardabweichung angegeben.

Bei den Messungen der NT-4/5-Konzentrationen erhielt man insgesamt nur sehr kleine Werte. Die höchste Konzentration für NT-4/5 in der Fibroblastengruppe wurde nach 72 h gemessen. Sie betrug 36 +/- 10 pg / ml. Danach fiel die Konzentration wieder ab. Nur bei den NT-4/5-Konzentrationen konnte eine etwas höhere Expression der Fibroblasten gegenüber den Myofibroblasten beobachtet werden. Die höchste NT-4/5-Konzentration unter Myofibroblasten war nach 72 h erreicht und betrug 19 +/- 1 pg / ml. Zu keiner Zeit war die NT-4/5-Expression signifikant erhöht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten mehr Neurotrophine bilden als Fibroblasten. Dies betraf v.a. die beiden Neurotrophine BDNF und NGF. Für NT-3 und NT-4/5, die insgesamt in geringeren Mengen produziert wurden, war der Unterschied zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten nicht mehr so groß.

4.1.2.2 Neurotrophin-Produktion in primären Zellen

Analoge Versuche wurden mit primären Lungenfibroblasten aus unserem Labor vorgenommen. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Wieder wurden die Neurotrophin-Konzentrationen gegen die Zeit aufgetragen.

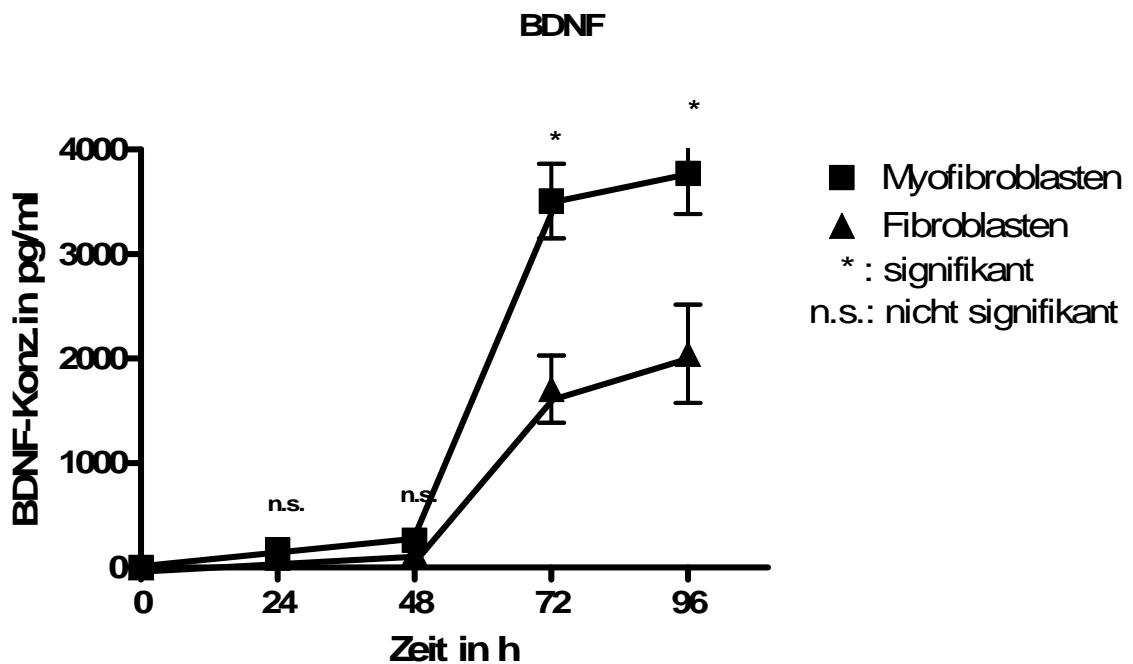


Abbildung 14: BDNF-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen. Die BDNF-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten wurden nach bestimmten Zeitabständen mittels ELISA gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=4) +/- Standardabweichung angegeben.

Insgesamt fanden sich höhere BDNF-Konzentrationen in den Versuchen mit primären Fibroblasten und Myofibroblasten als bei den Versuchen mit der Fibroblasten-Linie. Für die BDNF-Expression war eine signifikant erhöhte Konzentration erst nach 72 h zu messen. Davor unterschieden sich die BDNF-Konzentrationen unter Fibroblasten und Myofibroblasten kaum voneinander. Bei den Fibroblasten fand sich die höchste Konzentration von 2044 +/- 469 pg / ml nach 96 h, bei den Myofibroblasten war der höchste Wert von 3772 +/- 388 pg / ml nach 96 h zu finden.

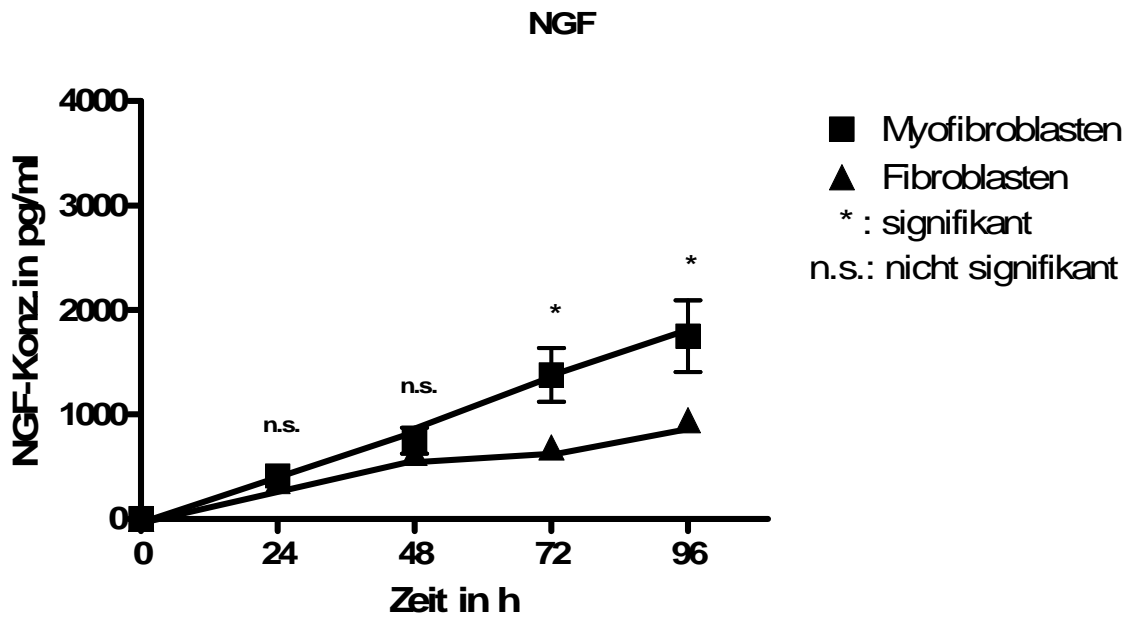


Abbildung 15: NGF-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen. Die Konzentrationen von NGF in primären Fibroblasten und Myofibroblasten wurden mittels ELISA nach bestimmten Zeitintervallen gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=4) +/- Standardabweichung angegeben.

Auch für die NGF-Expression beobachtete man höhere Konzentrationen in Versuchen mit primären Zellen als mit der Fibroblasten-Linie. Bei den Fibroblasten erhielt man einen flacheren Anstieg der NGF-Konzentrationen als unter den Myofibroblasten. In beiden Fällen war der Anstieg fast linear. Die höchste NGF-Konzentration in der Fibroblastengruppe war nach 96 h zu erkennen und betrug 945 +/- 78 pg / ml. In der Myofibroblastengruppe ergab die höchste NGF-Konzentration 1748 +/- 343 pg / ml nach 96 h. Die Unterschiede waren erst nach 72 h signifikant.

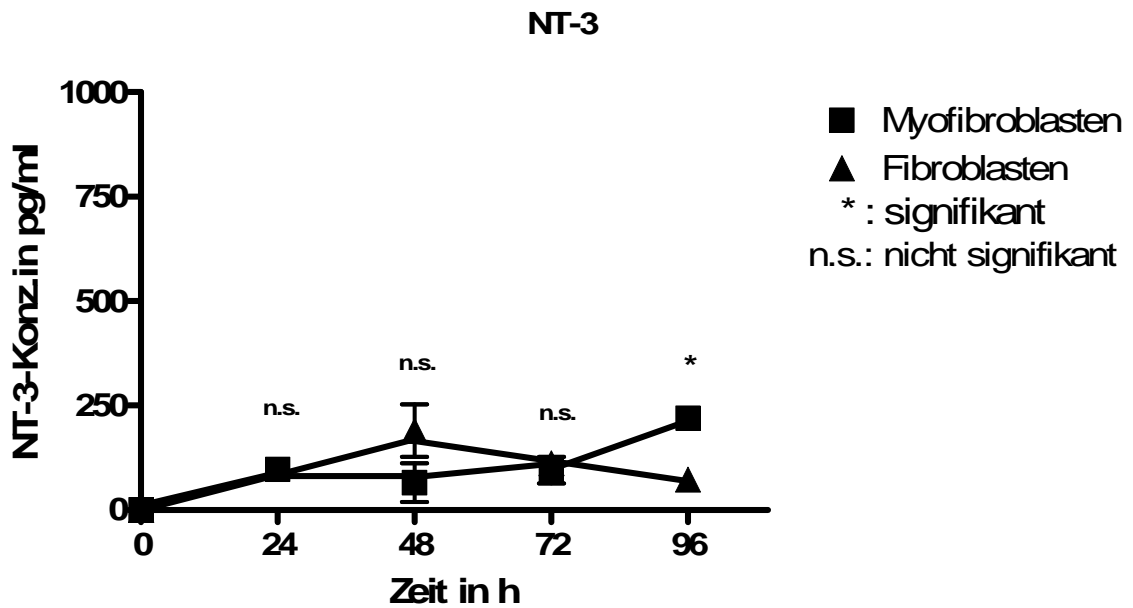


Abbildung 16: NT-3-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen. Die NT-3-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten wurden mittels ELISA nach bestimmten Zeitintervallen gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=3) +/- Standardabweichung angegeben.

Für die Expression des Neurotrophins NT-3 waren die Konzentrationen unter den primären Zellen nur nach 24 h und 96 h signifikant erhöht in der Myofibroblastengruppe. Die höchste Konzentration betrug 206 +/- 47 pg / ml nach 48 h in der Fibroblastengruppe. Danach fiel die Konzentration wieder ab. In der Myofibroblastengruppe wurde die höchste NT-3-Konzentration nach 96 h gemessen und machte 220 +/- 4 pg / ml.

NT-4

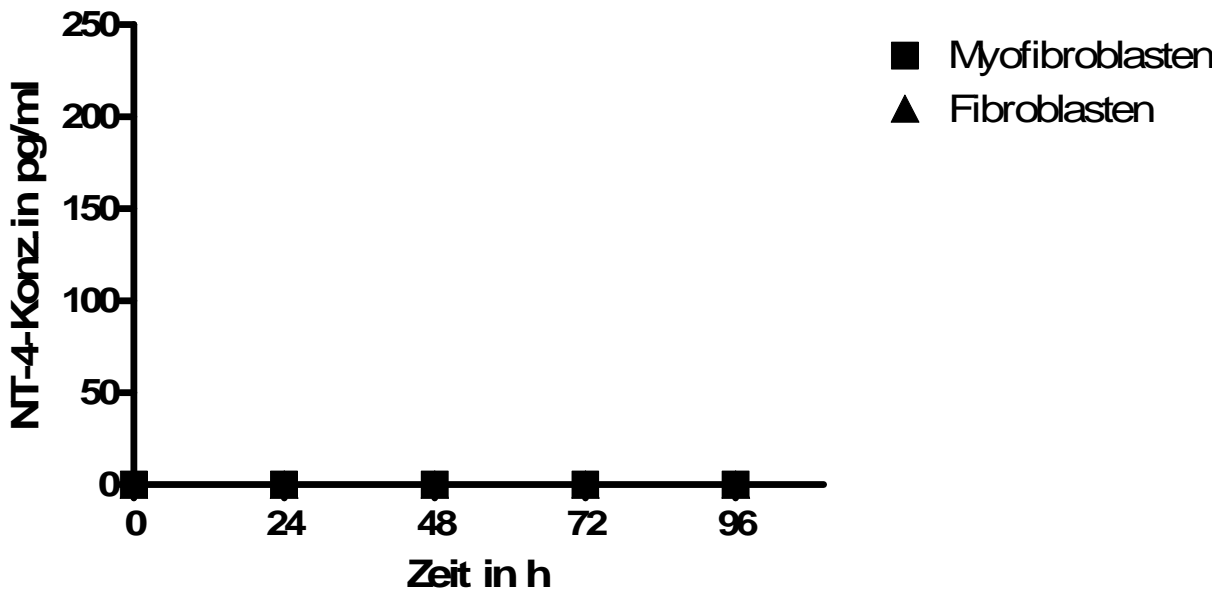


Abbildung 17: NT-4/5-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen. Die NT-4/5-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten wurden mittels ELISA nach bestimmten Zeitintervallen gemessen. Die Daten werden als Mittelwerte (n=2) +/- Standardabweichung angegeben.

Im Gegensatz zu der Fibroblasten-Linie konnte die NT-4/5-Konzentration in der Gruppe der primären Zellen nicht gemessen werden.

Insgesamt konnte auch bei den Versuchen mit den primären Lungenzellen eine verstärkte Neurotrophin-Produktion unter den Myofibroblasten gezeigt werden, auch hier vor allem für BDNF und NGF.

4.1.2.3 Vergleich Fibroblasten-Linie mit primären Zellen

Vergleicht man nun die Ergebnisse der primären Zellen mit denen der Fibroblasten-Linie, so fanden sich bei den primären Zellen höhere Neurotrophin-Spiegel sowohl in Fibroblasten als auch in Myofibroblasten. Dies traf vor allem für die BDNF- und die

NGF-Expression zu. Bei NT-3 waren die Unterschiede nicht mehr so deutlich und die NT-4/5-Expression konnte aufgrund fehlender Werte bei den primären Zellen nicht verglichen werden.

4.2 Unterschiedliche Neurotrophinrezeptor-Expression bei Fibroblasten und Myofibroblasten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die Neurotrophin-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten voneinander unterscheidet, wurde anschließend auch untersucht, inwiefern die Expression der Neurotrophinrezeptoren variiert. Dazu wurden wiederum zwei Zellreihen angesetzt, zum einen unstimulierte Fibroblasten und zum anderen durch TGF- β 1 stimulierte Myofibroblasten. Erneut wurden die Zellen nach bestimmten Zeitabständen lysiert und ihre RNA für die anschließenden PCR's gewonnen. Die PCR-Ergebnisse sind im Folgenden abgebildet.

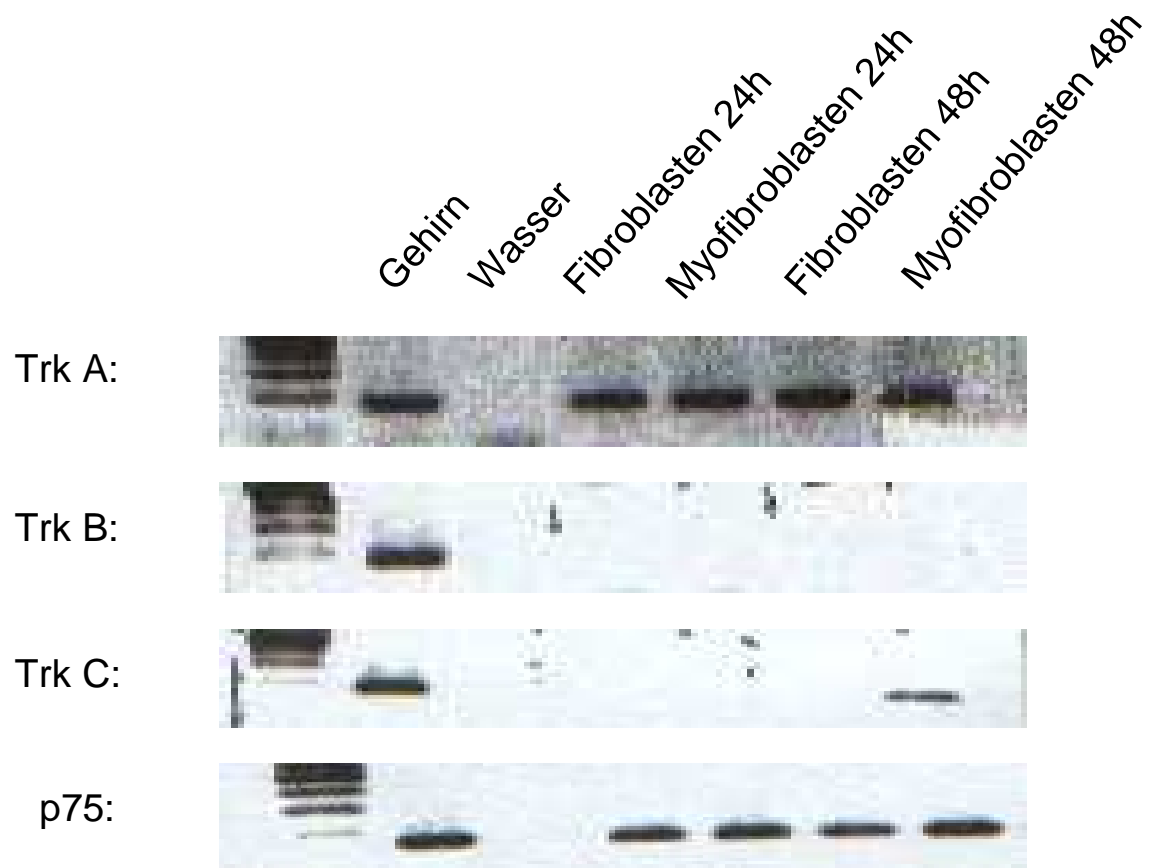


Abbildung 18: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten. Die Abbildung zeigt die PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten nach 24 und 48 Stunden neben der Positiv- und Negativprobe. n=3

Die Abbildung 18 zeigte für den Neurotrophinrezeptor Trk A sowohl in Fibroblasten als auch in Myofibroblasten eine RNA-Expression. Die PCR-Ergebnisse für Trk B ließen nur in der Positivkontrolle des Gehirns eine RNA-Expression erkennen. Weder in Fibroblasten noch in Myofibroblasten ließ sich die RNA für diese Neurotrophinrezeptoren nachweisen. Bei der PCR mit Trk C-Primern zeigte sich die entsprechende RNA in der Positivkontrolle und nach 48 h unter den Myofibroblasten. In der Fibroblastengruppe wurde keine Trk C-RNA beobachtet. Die PCR auf den Pan-Neurotrophin-Rezeptor p75 ergab eine RNA-Expression sowohl in der Fibroblastengruppe als auch in der Myofibroblastengruppe zu jeder Zeit.

Analoge Versuche wurden mit den primären Zellen durchgeführt. Hierbei konnten einige Übereinstimmungen in der Neurotrophinrezeptor-Expression zwischen Fibroblasten und primären Fibroblasten gefunden werden. Allerdings ergaben sich auch Unterschiede.

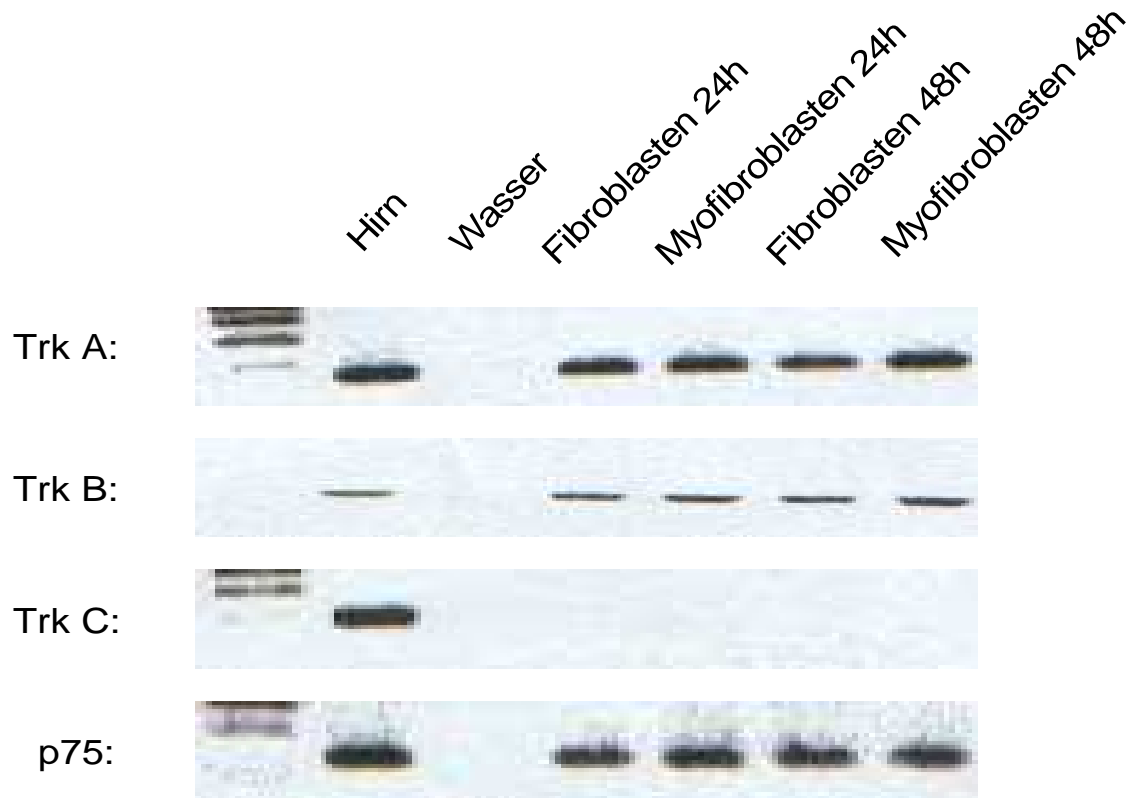


Abbildung 19: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten. Die Abbildung zeigt die PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach 24 und 48 Stunden neben der Positiv- und Negativprobe. n=3

Aus der Abbildung 19 ist zu entnehmen, dass sowohl bei den Fibroblasten als auch bei den Myofibroblasten RNA für die Neurotrophin-Rezeptoren Trk A, Trk B und p75 exprimiert wurde. Bei der PCR auf Trk C wurde weder für Fibroblasten noch für Myofibroblasten eine RNA gefunden.

Vergleicht man nun die RNA-Expression der primären Fibroblasten mit der der Fibroblasten-Linie, findet man eine unterschiedliche Expression der RNA für Trk B und Trk C.

4.3 Erhöhter Stoffwechsel der Myofibroblasten gegenüber den Fibroblasten und Beteiligung der Neurotrophine am Stoffwechsel

Um den Einfluss der Neurotrophine auf den Stoffwechsel von Fibroblasten und Myofibroblasten zu untersuchen, wurden Fibroblasten und durch TGF- β 1 stimulierte Myofibroblasten auf 96-well-Platten angesetzt und teilweise mit Anti-Neurotrophinen inhibiert. Nach bestimmten Zeitintervallen (nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) wurde Resazurin zu den Zellen gegeben, das in der Atmungskette bestehend aus verschiedenen Redox-Systemen der lebenden Zellen zu Resofurin reduziert wird. Dieses Resofurin kann fluorometrisch gemessen werden.

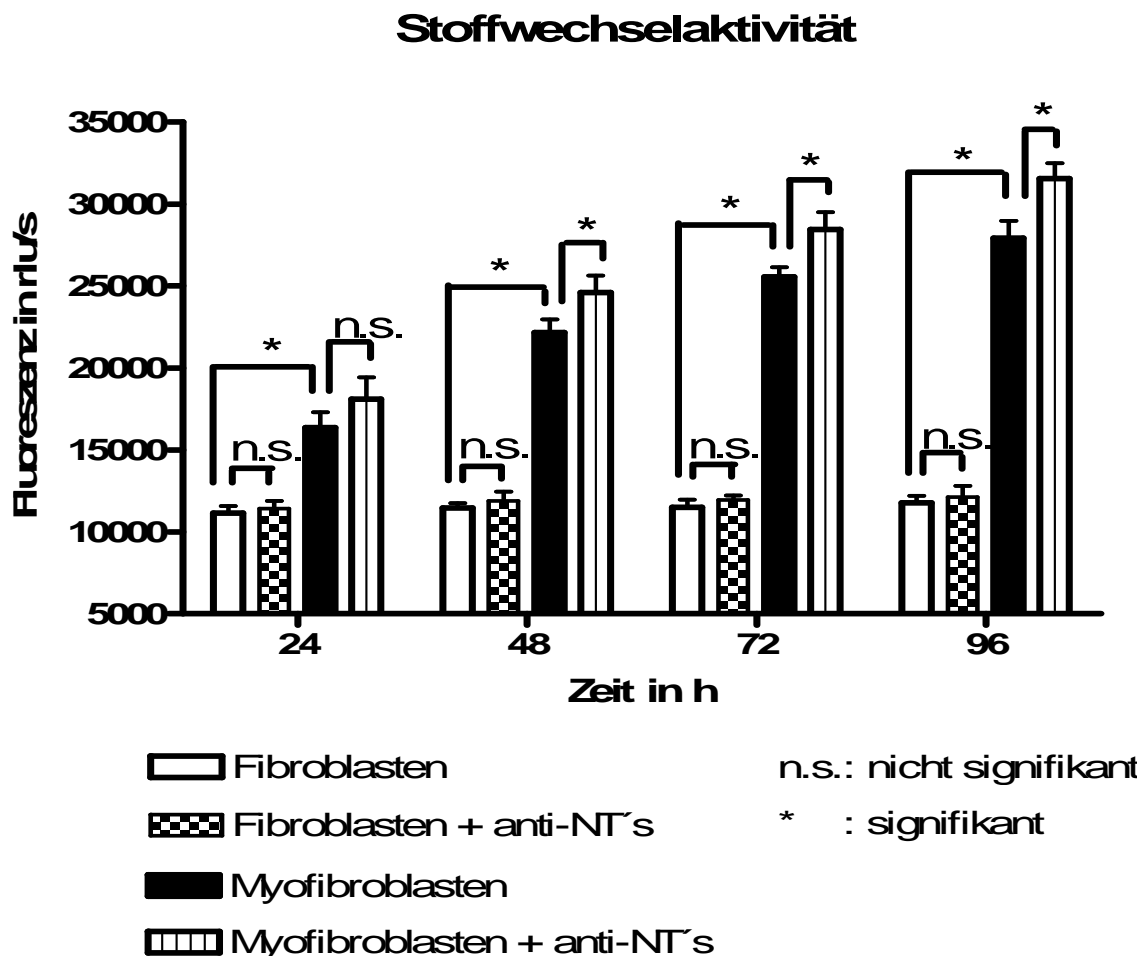


Abbildung 20: Darstellung der Stoffwechselaktivität von Fibroblasten und Myofibroblasten ohne und mit Inhibierung durch Anti-Neurotrophine nach bestimmten Zeitintervallen. Mittels Celltiter Blue-Test wurde der Stoffwechsel von Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen gemessen. In der Abbildung sieht man die verschiedenen Stoffwechselaktivitäten von Fibroblasten und Myofibroblasten ohne und mit Inhibierung durch Anti-Neurotrophine. Die Daten werden als Mittelwerte (n=5) +/- Standardabweichung angegeben. rlu / s: relative light units / second

In der Abbildung 20 ist die gemessene Fluoreszenz der jeweiligen Zellart in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Hier ist zu erkennen, dass der Stoffwechsel der Myofibroblasten im Vergleich zum Stoffwechsel der Fibroblasten erhöht war. Zunächst sieht man, dass sich der Stoffwechsel der Fibroblasten zu jedem Messzeitpunkt bei 11479 +/- 132 rlu / s ungefähr konstant hielt. Auch nach Inhibierung mit den Anti-Neurotrophinen änderte sich die Stoffwechselaktivität unter den Fibroblasten nicht signifikant und lag bei 11841 +/- 148 rlu / s. Im Gegensatz dazu erkennt man in der Myofibroblastengruppe einen kontinuierlichen Anstieg der Stoffwechselaktivität. Nach 24 h fand sich ein Wert von 16347 +/- 940 rlu / s, der stetig bis auf Werte um 27926 +/- 1059 rlu / s nach 96 h stieg. Der Unterschied zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten war zu jedem Zeitpunkt signifikant. Wurden die Myofibroblasten nun auch mit Anti-Neurotrophinen inhibiert, kam es noch zu einer schwachen Zunahme der Stoffwechselaktivität in dieser Gruppe. Die Werte schwankten zwischen 18106 +/- 1311 rlu / s nach 24 h und 31558 +/- 939 rlu / s nach 96 h. Ein signifikanter Unterschied stellte sich aber erst nach 48 h ein.

4.4 Stärkere Zellproliferation von Myofibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten und Neurotrophin-Beteiligung an der Proliferation der Zellen

Um die Beteiligung der Neurotrophine an der Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten zu untersuchen, wurde ein BrdU-Zellproliferations-Essay durchgeführt. Das dabei verwendete BrdU wird anstatt des Thymidins in die DNA eingebaut. Bei der DNA-Synthese, die eine Proliferation der Zellen anzeigt, wird vermehrt BrdU eingebaut. Dieses BrdU kann aufgrund seiner lumineszenten Eigenschaften detektiert werden.

So wurden auf einer 96-well-Platte Fibroblasten angesetzt und in verschiedene Gruppen unterteilt, wobei eine Gruppe unstimuliert blieb und als Kontrolle diente. Eine zweite Gruppe inhibierte man mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Neurotrophine (anti-BDNF, anti-NGF). Ferner wurde eine weitere Gruppe mit TGF- β 1 stimuliert (wobei sich Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzierten) und eine letzte Gruppe wurde gleichzeitig mit TGF- β 1 und den Anti-Neurotrophinen stimuliert.

Nach erfolgter Stimulation bzw. Inhibition wurden die Zellen über 48h inkubiert. Anschließend wurde BrdU zu den Zellen pipettiert und die Zellen inkubierten nochmals. Nach einigen Stunden wurde das in die DNA eingebaute BrdU mittels Chemilumineszenz detektiert. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Zellproliferation

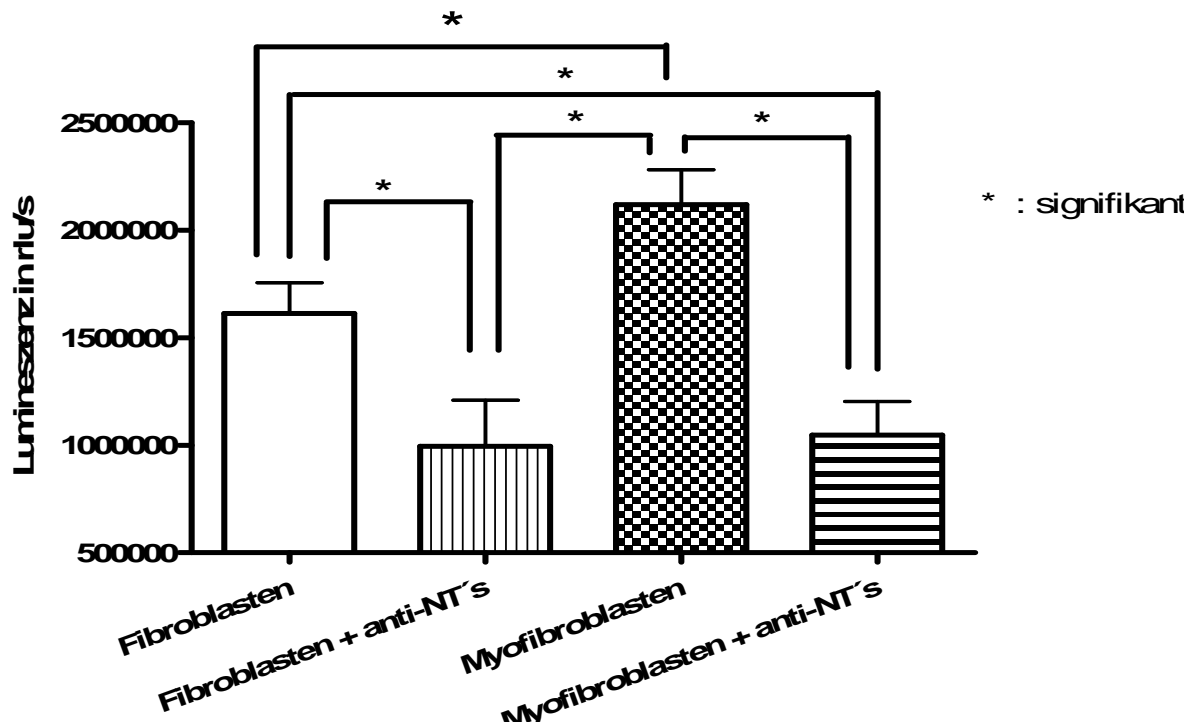


Abbildung 21: Zellproliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten und ihre Inhibition mit Anti-Neurotrophinen. Mittels BrdU-Zellproliferations-Essay wurde durch Einbau von BrdU statt Thymidin in die DNA die Zellproliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten gemessen. Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation mit Anti-Neurotrophinen inhibiert wurde. Die Daten werden als Mittelwerte (n=3) +/- Standardabweichung angegeben. rlu / s: relative light units / second

In der Abbildung 21 sind die jeweiligen Chemilumineszenzwerte (in relative light units pro Sekunde) der verschiedenen Versuchsgruppen (Fibroblasten zur Kontrolle und als Referenzwert, Fibroblasten + Anti-Neurotrophine, Myofibroblasten, Myofibroblasten + Anti-Neurotrophine) nach 48h aufgetragen. Bei den unstimulierten Fibroblasten wurde eine Chemilumineszenz von 1613000 +/- 143500 rlu / s gemessen. Waren die Fibroblasten mit Anti-Neurotrophinen inhibiert worden, so sank die Chemilumineszenz auf Werte von 994000 +/- 215400 rlu / s. Ähnliche Werte (1048000 +/- 155500 rlu / s) erhielt man, wenn man die Fibroblasten zunächst mit TGF-β1 stimulierte und sie sich in Myofibroblasten verwandelten, und dann mit Anti-Neurotrophinen inhibierte. Nach Stimulation mit TGF-β1 allein stieg die Chemilumineszenz nennenswert auf 2119000 +/- 163100 rlu / s.

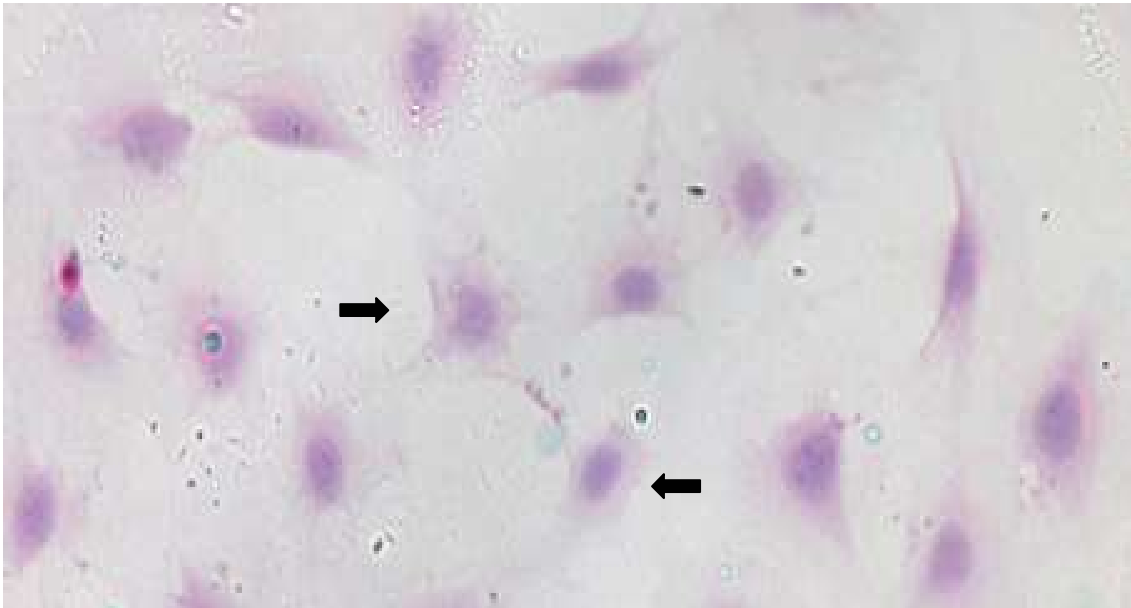
4.5 Unterschiede in der Morphologie zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten und Beteiligung der Neurotrophine an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten

Die HE-Färbung von Fibroblasten, Myofibroblasten und mit neutralisierenden Anti-Neurotrophinen inhibierten Myofibroblasten zeigte unter dem Mikroskop morphologische Unterschiede. So ist den nachfolgenden Abbildungen zu entnehmen, dass sich Fibroblasten als eher rundliche Zellen darstellten. Ihr Zellkern befand sich mitten im Zytosol und sie hatten nur kurze Ausläufer. Nach Stimulation der Fibroblasten mit TGF- β 1 differenzierten sich diese nach 48 Stunden zu Myofibroblasten. Die Bilder zeigen die Myofibroblasten als eher länglichere Zellen mit randständigem Kern und langen Ausläufern. Wurden nun die Fibroblasten mit TGF- β 1 stimuliert und die Neurotrophin-Wirkung gleichzeitig mit Anti-Neurotrophinen inhibiert, zeigte sich, dass die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten blockiert wurde und die Zellen sich ebenfalls mehr rundlich und mit kurzen Ausläufern ähnlich den Fibroblasten darstellten.

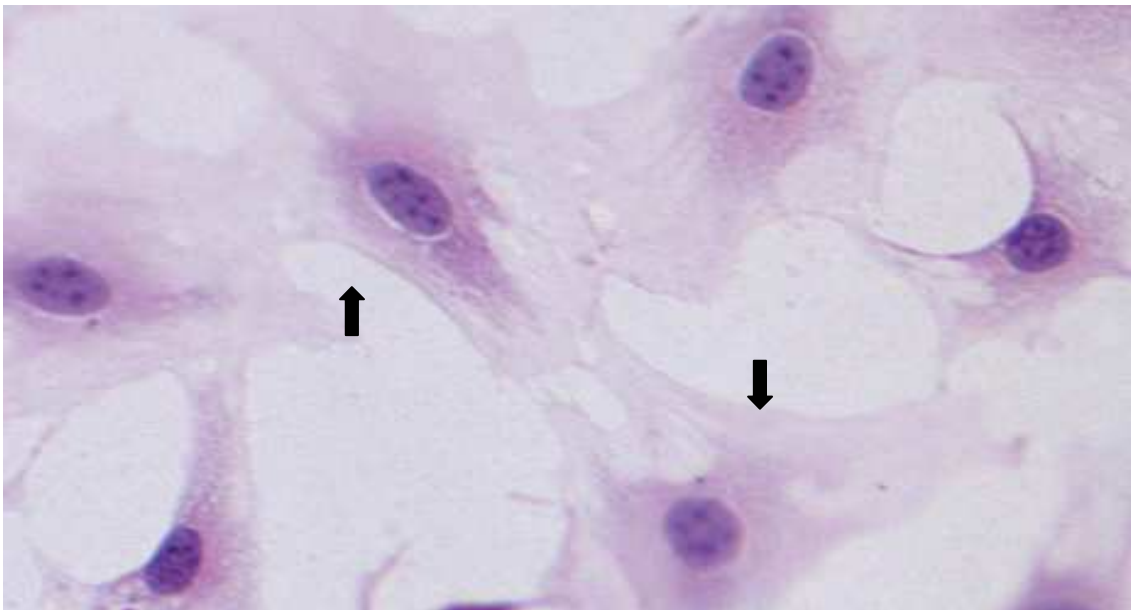
Im Folgenden sind die Aufnahmen von Fibroblasten, Myofibroblasten und Myofibroblasten unter Neurotrophin-Inhibition in der jeweiligen Vergrößerung dargestellt.

Fibroblasten

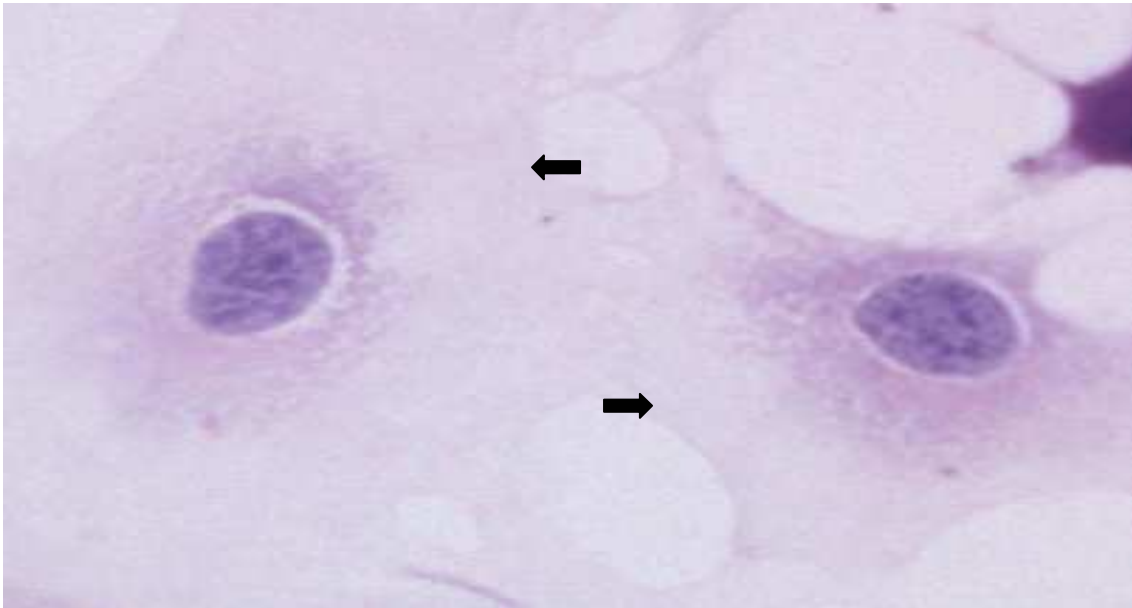
100-fache Vergrößerung



200-fache Vergrößerung

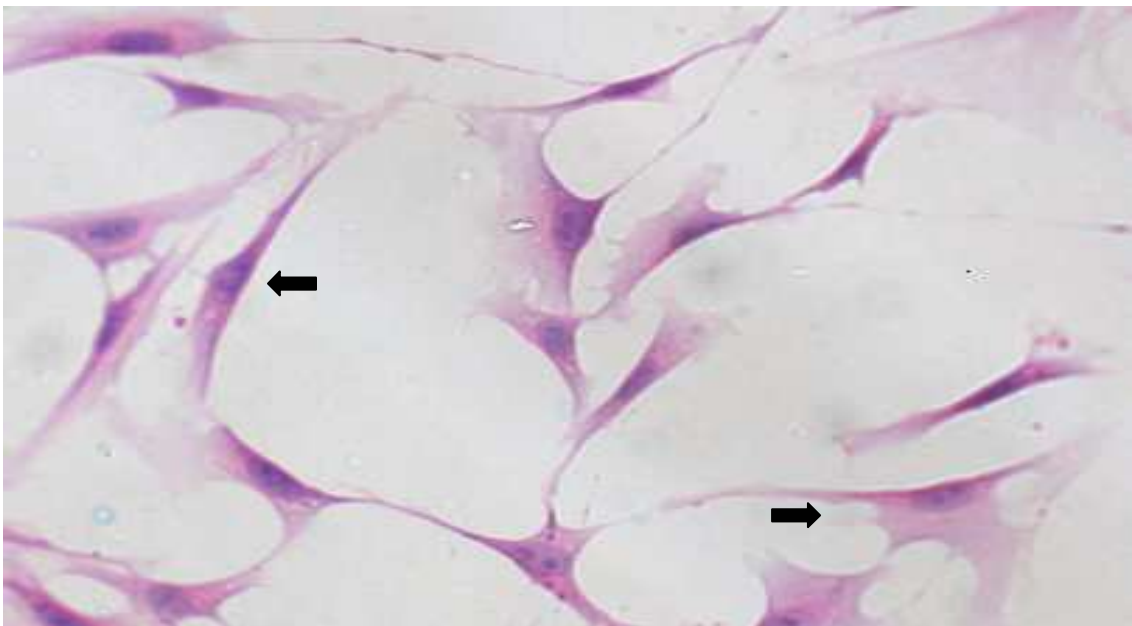


400-fache Vergrößerung

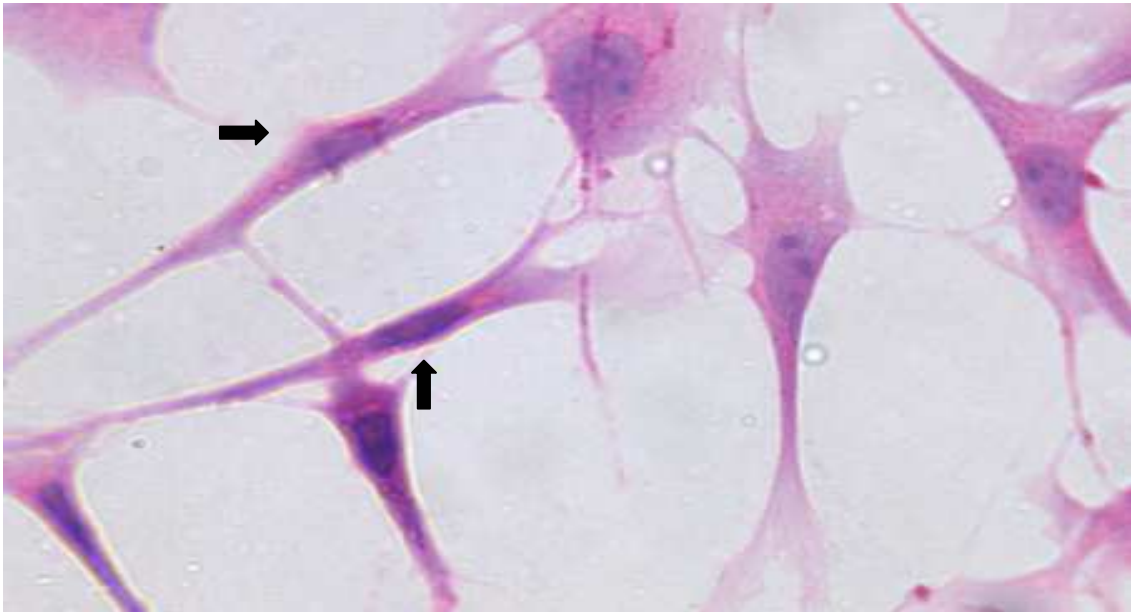


Myofibroblasten

100-fache Vergrößerung



200-fache Vergrößerung

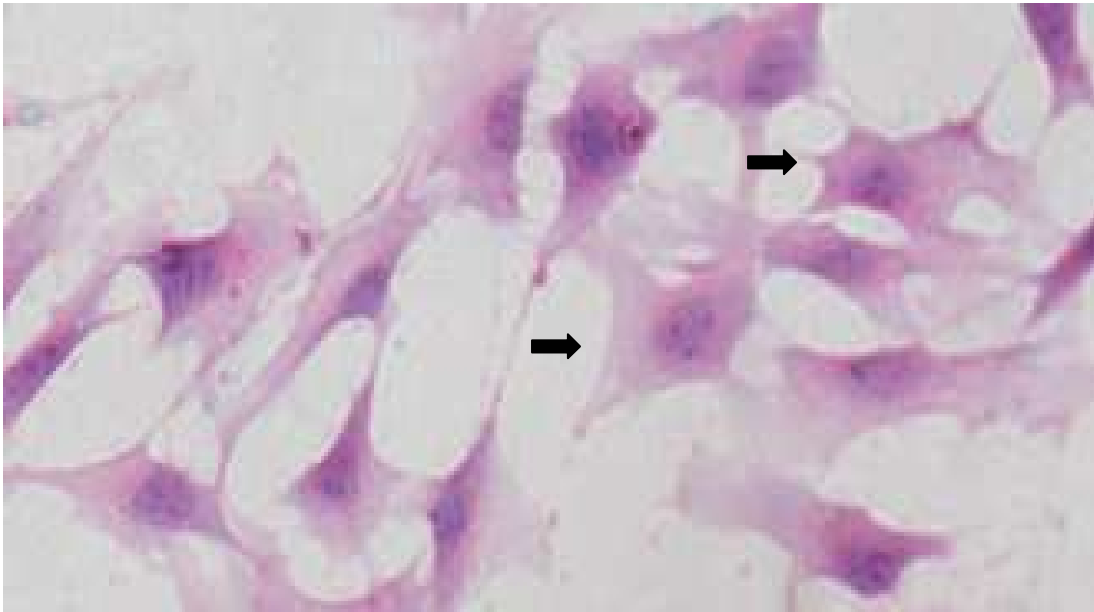


400-fache Vergrößerung

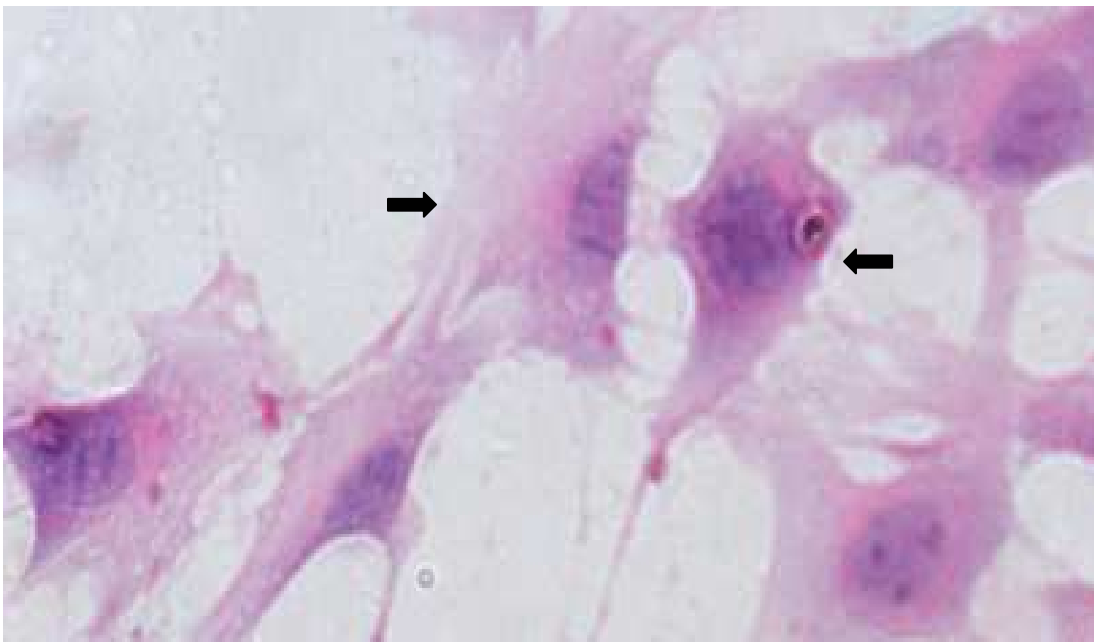


Myofibroblasten unter Neurotrophin-Inhibition

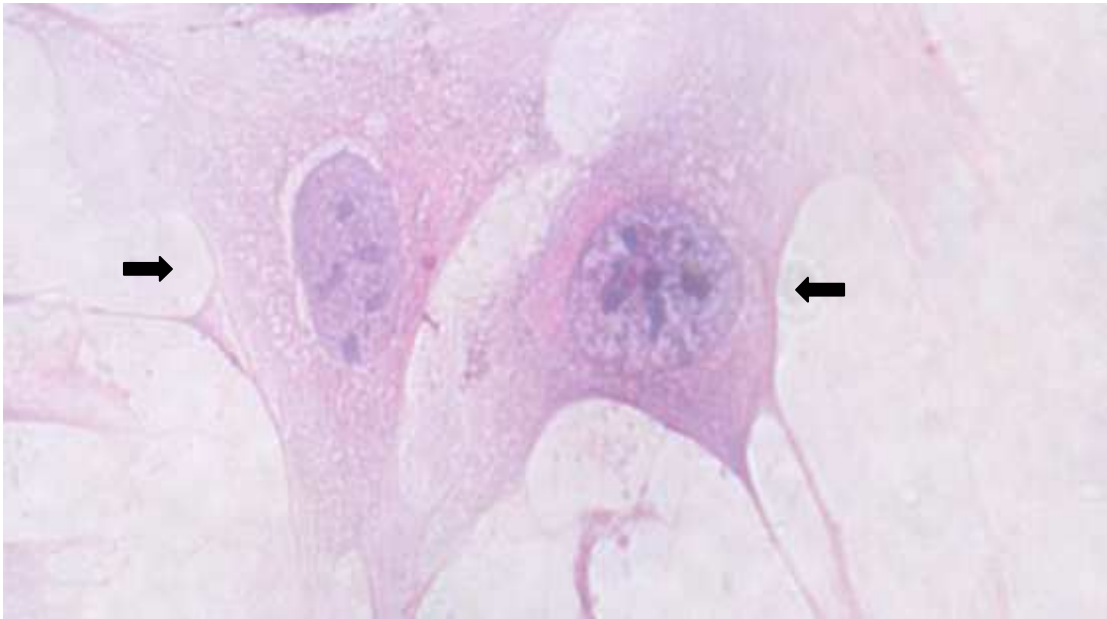
100-fache Vergrößerung



200-fache Vergrößerung



400-fache Vergrößerung



V. DISKUSSION

Chronische Lungenerkrankungen wie das allergische Asthma bronchiale sind durch funktionellen und morphologischen Umbau der pulmonalen Strukturen gekennzeichnet. Das Immunsystem und auch das Nervensystem sind in die Pathomechanismen dieser Erkrankung involviert. Beide interagieren über verschiedene Mediatoren miteinander, zu denen auch die Neurotrophine zählen.

Neurotrophine werden in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert und von diesen ausgeschüttet. Zu diesen Zellen gehören unter anderem Neurone, Zellen des Immunsystems (Ehrhard et al., 1993) und strukturelle Zellen wie zum Beispiel Fibroblasten (Nockher and Renz, 2003). Die vier Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 spielen nach bisherigen Erkenntnissen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und dem Überleben von Neuronen. Nach neueren Untersuchungen sind sie aber auch von Bedeutung für die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von Immunzellen. Ferner lässt sich auch ein Einfluss auf strukturelle Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten / Myofibroblasten vermuten. Myofibroblasten differenzieren sich aus Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β 1 (Zhang, Phan, 1999, Phan 2008) und sind bei chronischen Lungenerkrankungen vermehrt anzutreffen (Bonini et al., 1996). Zusätzlich zum gehäuften Auftreten von Myofibroblasten finden sich in den Atemwegen von chronisch Lungenkranke auch erhöhte Konzentrationen der oben genannten Neurotrophine (Bonini et al., 1996, Olgart-Höglund et al., 2002).

Deshalb beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit dem Einfluss von Neurotrophinen auf Stoffwechsel, Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale. Untersucht wurden Fibroblasten und Myofibroblasten hinsichtlich ihrer Neurotrophin- und Neurotrophinrezeptor-Expression, ihres Stoffwechsels und ihrer Morphologie. Insbesondere wurde der Einfluss der Neurotrophine auf die Proliferation und die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten untersucht.

Um die Beeinflussung von Fibroblasten und Myofibroblasten durch Neurotrophine zu untersuchen, wurden Fibroblasten und Myofibroblasten zunächst in Bezug auf ihre Neurotrophin- und Neurotrophinrezeptor-Expression miteinander verglichen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen Olgart et al., 2001 konnte in der PCR und auch im ELISA gezeigt werden, dass sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten Neurotrophine produzierten. Jedoch exprimierten Myofibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten um ein vielfaches mehr Neurotrophine. Dieses traf für BDNF, NGF und NT-3 zu. Die Neurotrophin-Expression war für BDNF 15-mal, für NGF 6-mal und für NT-3 4-mal höher in den Myofibroblasten als in den Fibroblasten. Die Werte für NT-4/5 waren nicht nachweisbar, so dass sie weder verglichen noch verwertet werden konnten. Ähnliche Ergebnisse erhielt man für die Neurotrophin-Expression in primären Fibroblasten und primären Myofibroblasten. Hier waren die gemessenen Werte für die primären Zellen allerdings insgesamt um einiges höher.

Myofibroblasten, die vermehrt bei chronischen Lungenerkrankungen vorkommen, produzierten vermehrt Neurotrophine. Auch lassen sich erhöhte Mengen an Neurotrophinen in den Atemwegen von Patienten mit chronischem Asthma bronchiale finden, was von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt wurde. Diese fanden in den Lungen von Asthmatikern vermehrt Neurotrophine, und hier vor allem NGF (Bonini et al., 1996; Virchow et al., 1998; Olgart-Höglund et al., 2002). Aber nicht nur Fibroblasten und Myofibroblasten produzieren Neurotrophine. Wie andere Arbeitsgruppen gezeigt haben, exprimieren auch Neurone, Entzündungszellen wie T- und B-Lymphozyten (Ehrhard et al., 1993), Makrophagen (Ehrhard et al., 1993), Mastzellen (Nilsson et al., 1997), Eosinophile (Solomon et al., 1998) und strukturelle Zellen wie Epithelzellen (Fox et al., 2001) ebenfalls Neurotrophine und führen so zu einem erhöhten Neurotrophin-Spiegel in den Atemwegen von chronisch Lungenkranken.

Die oben genannten Ergebnisse lassen eine exokrine und vielleicht auch eine autokrine Stimulation der Neurotrophin-Expression und -Sekretion vermuten. Damit hätten die verschiedenen Neurotrophine einen potenzierenden Effekt auf ihre eigene Produktion. Für NGF wurde dies von Matsuda et al., 1998 und Micera et al., 2001 nachgewiesen.

Daneben gibt es aber auch andere Mechanismen, die zu einer verstärkten Neurotrophin-Produktion in Fibroblasten / Myofibroblasten führen. Hier wäre die Erhöhung der Neurotrophin-Expression durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α oder durch die Th₂-Zellen-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu nennen, wie Olgart et al., 2001 gezeigt haben. Unsere Arbeitsgruppe konnte für pulmonale Epithelzellen ebenfalls eine

verstärkte Neurotrophin-Expression nach Stimulation mit eben genannten Zytokinen nachweisen (Hahn et al., 2006). Demnach können sowohl die bei Entzündungen vermehrt auftretenden Myofibroblasten als auch die Epithelzellen zu den erhöhten Neurotrophin-Spiegeln in den Atemwegen von Asthmatikern beitragen.

Bezüglich der Neurotrophinrezeptoren konnte mittels PCR eine unterschiedliche Expression zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten gezeigt werden. So exprimierten sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten den niedrigaffinen Neurotrophinrezeptor p75, wie dies für Fibroblasten von der Arbeitsgruppe Freund et al., 2003 ebenfalls nachgewiesen wurde. Gleiche Ergebnisse erhielt man für die primären Fibroblasten und primären Myofibroblasten.

Anders schaute es bei den hochaffinen Trk-Rezeptoren aus. Der Trk A-Rezeptor, an den NGF bindet, wurde sowohl von der Fibroblasten-Linie als auch von der sich hieraus differenzierten Myofibroblasten-Linie exprimiert. Auch bei den primären Fibroblasten und primären Myofibroblasten fand sich eine Trk A-Rezeptor-Expression. Dieses konnte schon von Micera et al., 2001 gezeigt werden. Für den Trk B-Rezeptor, an den BDNF und NT-4 binden, fanden sich unterschiedliche Ergebnisse. Weder die Fibroblasten- noch die Myofibroblasten-Linie exprimierten den Trk B-Rezeptor. Unter den primären Zellen aber konnte man eine Trk B-Rezeptor-Expression messen. Beim Trk C-Rezeptor wiederum, der von NT-3 gebunden wird, wurde keine Expression unter der Fibroblasten-Linie festgestellt, in der Myofibroblasten-Linie hingegen fand sich nach einem bestimmter Zeitintervall eine Trk C-Rezeptor-Expression, die vorher nicht nachzuweisen war. Untersuchte man die primären Zellen auf Trk C-Expression, so wurde bei ihnen keine Trk C-Expression gefunden.

Womöglich waren die Zeitintervalle zu kurz gewählt, in denen die Expression der Neurotrophinrezeptoren untersucht worden war. Es wäre eventuell möglich, dass Myofibroblasten erst nach einer bestimmten Zeit nach Stimulation mit Neurotrophinen mit der Expression der Neurotrophinrezeptoren beginnen. Denn wie diese Arbeit zeigt, wurden mit längerem Zeitabstand auch vermehrt Neurotrophine von Fibroblasten und in noch höheren Dosen von Myofibroblasten gebildet. Wenn also Myofibroblasten und möglicherweise auch Fibroblasten über einen bestimmten Zeitraum mit Neurotrophinen stimuliert würden, dann erst könnte eine Induktion der Neurotrophinrezeptor-Expression erfolgen. So wies die Arbeitsgruppe Ouyang et al., 2005 eine NGF-induzierte RNA-Expression für Trk A nach. In den vorliegenden Ergebnissen wurde

nämlich nach einem bestimmten Zeitintervall die RNA für Trk C exprimiert, die zuvor nicht nachweisbar war. Folglich könnte der Zeitraum, über den Fibroblasten und Myofibroblasten mit NT-3 stimuliert werden müssen, kürzer sein als die Zeiträume, über die Fibroblasten und Myofibroblasten mit BDNF und NGF stimuliert werden müssen. Indessen haben Ia Sala et al., 2000 aufzeigen können, dass es bei Differenzierung von Blut-Monozyten zu dendritischen Zellen zum Verlust der Trk A-Expression kommt. So wäre es doch auch möglich, dass andere Zellen wie Fibroblasten im Zuge ihrer Differenzierung zu Myofibroblasten auch eine Veränderung in ihrer Trk-Expression aufweisen.

Unter Umständen könnten Fibroblasten und auch Myofibroblasten Neurotrophinrezeptoren erst exprimieren, wenn die Zellen nicht nur über einen bestimmten Zeitraum, sondern auch mit einer bestimmten Dosis an Neurotrophinen stimuliert werden. Die mögliche Dosischwelle könnte für die unterschiedlichen Neurotrophine verschieden sein. Sie könnte zum Beispiel für NT-3 niedriger ausfallen als für BDNF und NGF, die erst ab einer höheren Dosis die Neurotrophinrezeptor-Expression induzieren. Das könnte vielleicht daran liegen, dass die konstitutionelle Expression von BDNF und NGF ebenfalls höher ist als die von NT-3 (Hikawa et al., 2002) und die Zellen an diese höheren Dosen adaptiert sind und demzufolge höhere Dosen benötigen, um die spezifischen Trk-Rezeptoren zu exprimieren. Analog könnte auch das Ergebnis der primären Zellen zu werten sein, wo sowohl primäre Fibroblasten als auch primäre Myofibroblasten mehr BDNF als die Fibroblasten-Linie produzierten und womöglich dadurch die Expression des Trk B-Rezeptors induzierten.

Weiterhin wurden Fibroblasten und Myofibroblasten im Hinblick auf ihren Stoffwechsel miteinander verglichen. Im Celltiter Blue-Test wird der Stoffwechsel anhand Reduzierung von Resazurin zu Resofurin in der Atmungskette durch lebende Zellen gemessen. Je mehr Resazurin zu Resofurin reduziert wird, desto stärker ist der Stoffwechsel der Zellen.

Insgesamt stellte sich ein erhöhter Stoffwechsel der Myofibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten dar. Wurden die Fibroblasten mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Neurotrophine inhibiert, so hatte dies kaum Auswirkung auf die Stoffwechselaktivität. Bei den Fibroblasten schienen die Neurotrophine also keinen Einfluss auf den Stoffwechsel zu haben. Wurden hingegen die Myofibroblasten mit neutralisierenden

Anti-Neurotrophinen inhibiert, war ein schwacher Anstieg der Stoffwechselaktivität zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass Myofibroblasten aufgrund ihrer Umbauvorgänge in der Phase der Differenzierung einen höheren Umsatz haben. Weiterhin könnte man vermuten, dass Myofibroblasten, die vermehrt in entzündeten Geweben vorkommen (Bonini et al., 1996), die aktiveren und damit stoffwechselreicheren Zellen sind. Sie produzieren mehr extrazelluläre Matrix und sind mithilfe ihrer kontraktile Elemente an allergischen Reaktionen und an Wundheilung beteiligt. Über verschiedene Mediatoren, zu denen auch die Neurotrophine zählen, werden sie in ihren Funktionen beeinflusst. Es besteht die Möglichkeit, dass Neurotrophine, die ebenfalls vermehrt in entzündeten Geweben gefunden werden (Olgart-Höglund et al., 2002), die Myofibroblasten hinsichtlich der Optimierung ihrer Stoffwechselfunktion beeinflussen. Wie oben beschrieben, reduzierten Neurotrophine in geringem Umfang den Stoffwechsel von Myofibroblasten. So könnten Neurotrophine den Stoffwechsel der Myofibroblasten reduzieren, um die Energie der Zelle bestmöglich in den Dienst der Entzündungsreaktion und Reparatur einzusetzen. Auf diese Weise würden bestimmte Enzyme im Stoffwechsel gehemmt und die Expression von kontraktile Elementen wie zum Beispiel Kollagen und smooth-muscle actin gesteigert. Die Arbeitsgruppe Zhang und Phan, 1999 belegte, dass die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten mit einer stärkeren Expression v.a. von smooth-muscle actin assoziiert ist.

Da nun gezeigt wurde, dass sich die Stoffwechsel von Fibroblasten und Myofibroblasten erheblich voneinander unterscheiden, eine Beteiligung von Neurotrophinen an diesem Stoffwechsel aber kaum zu finden war, interessierte, ob Neurotrophine an der Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten beteiligt sind. Hierfür wurden Fibroblasten mit TGF- β 1 stimuliert und wandelten sich so zu Myofibroblasten (Vaughan et al., 2000). Die Proliferation der beiden Zellarten wurde ohne und nach Inhibierung mit blockierenden Antikörpern gegen die Neurotrophine (anti-BDNF und anti-NGF) mittels BrdU-Zellproliferationstest gemessen. Im BrdU-Zellproliferationstest wird anstelle des Thymidins BrdU in die DNA eingebaut und mittels Chemilumineszenz detektiert. Gesteigerter Einbau des BrdU in die DNA bedeutet also eine verstärkte Zellproliferation.

In dieser Arbeit konnte ein vermehrter Einbau des BrdU in die DNA der Myofibroblasten nachgewiesen werden. Deswegen kann von einem gesteigerten Zellwachstum der Myofibroblasten, die vermehrt Neurotrophine exprimierten, gegenüber den Fibroblasten ausgegangen werden. Wurde nun die Neurotrophin-Wirkung durch neutralisierende Antikörper in Fibroblasten und Myofibroblasten inhibiert, stellte man einen deutlichen Abfall der Proliferation auf ungefähr ähnliche niedrige Werte fest. Hier war also eine Beteiligung der Neurotrophine an der Zellproliferation zu verzeichnen.

Aber die Proliferation nicht nur von Fibroblasten und Myofibroblasten wird durch Neurotrophine angeregt. Die Arbeitsgruppe Raychaudhuri et al., 2001 konnte nachweisen, dass NGF die Proliferation auch von Endothelzellen beeinflusst. Und andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Neurotrophine, hier vor allem NGF, die Proliferation, die Entwicklung und das Überleben auch von Neuronen (Levi-Montalcini, 1987; Aloe et al., 1997; Bonini et al., 2002; Freund and Frossard, 2004), Eosinophilen (Hamada et al., 1996), glatten Muskelzellen (Freund et al., 2002) und Lymphozyten (Thorpe et al., 1987) stimulieren.

Ein anderer wichtiger Aspekt dieser Dissertation ist die Untersuchung der Neurotrophin-Beteiligung an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten. Hierfür wurden zunächst die Fibroblasten und Myofibroblasten hinsichtlich ihrer Morphologie miteinander verglichen. In den angefertigten HE-Färbungen zeigte sich, dass Fibroblasten eher rundliche Zellen mit zentral gelegenem Kern darstellten. Myofibroblasten im Vergleich dazu bildeten längliche Zellen mit langen Zellausläufern und randständigem Kern. Wahrscheinlich sind diese morphologischen Veränderungen auf die vermehrte Expression von Kollagen und smooth-muscle actin zurückzuführen. Myofibroblasten besitzen somit eine kontraktile Komponente, mit der sie zum Beispiel für Kontraktionen der Atemwege im Asthmaanfall mitverantwortlich sind. Ferner können sie die extrazelluläre Matrix synthetisieren und haben somit eine strukturelle Funktion. Myofibroblasten entwickeln sich aus Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β 1 (Vaughan et al., 2000). Feng et al., 2005 haben gezeigt, dass es durch TGF- β 1-Stimulation über den Smad3-Weg zur verstärkten Transkription von α -SMA-Genen und damit zu vermehrter α -SMA-Expression kommt. Neben TGF- β 1 gibt es aber auch noch wenige andere bisher bekannte Faktoren, die zu einer TGF- β 1-unabhängigen

Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten führen. Dazu gehört zum Beispiel IL-6 (Gallucci et al., 2006). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Neurotrophine an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten beteiligt sind. Wurden nämlich die Fibroblasten mit TGF- β 1 stimuliert, und hätten sich auf diesem Weg zu Myofibroblasten differenzieren müssen, und gleichzeitig mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Neurotrophine inhibiert, so fand die Differenzierung zu Myofibroblasten nicht oder unvollständig statt. Das morphologische Korrelat der Myofibroblasten fehlte. Die Zellen blieben rund und hatten auch keine solch langen Ausläufer wie die Myofibroblasten.

Zusätzlich zur Beteiligung an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten vermögen die Neurotrophine auch die Migration und Kontraktion von Myofibroblasten (Micera et al., 2001) zu induzieren und die Kollagen- und Fibronectin-Synthese in Fibroblasten und Myofibroblasten zu stimulieren (Nithya et al., 2003). Außerdem wird die Expression von smooth-muscle actin in Myofibroblasten durch NGF stimuliert (Zhang und Phan, 1999).

Überdies werden auch andere Zellen neben den Fibroblasten in Bezug auf ihre Differenzierung durch Neurotrophine beeinflusst: So verstärkt zum Beispiel NGF die Differenzierung von Mastzellen (Böhm et al., 1986; Matsuda et al., 1991), Makrophagen (Susaki et al., 1996) und Lymphozyten (Thorpe and Perez-Polo, 1987). Ferner kommt es durch Stimulation von Neuronen mit Neurotrophinen zu einem Phänotypwechsel der Neurone mit Induktion einer Zytokin-Sekretion, die die Zellen normalerweise nicht exprimieren (Hunter et al., 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Neurotrophine an der Differenzierung von vielen verschiedenen Zellen, darunter Lymphozyten, Mastzellen und natürlich auch Fibroblasten, beteiligt sind, die allesamt eine wichtige Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale spielen.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten sich für die Zukunft neue Therapieoptionen für die Behandlung von chronischen Lungenerkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale entwickeln.

Einen möglichen Therapieansatz stellen die Neurotrophine selbst dar, die mit blockierenden Antikörpern inhibiert werden könnten. Dann würde nämlich die komplexe Kommunikation zwischen Neurotrophinen und Immunzellen, Neuronen und strukturellen Zellen im Krankheitsgeschehen unterbrochen und die Neurotrophine

hätten keine Wirkung mehr auf die jeweilige Zelle. Proliferation, Differenzierung oder auch verlängertes Überleben von Zellen, die an der Inflammation der Atemwege beteiligt sind, würden damit gehemmt.

In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, nochmal auf Eosinophile einzugehen. Sie spielen nämlich eine wichtige Rolle in der Initiierung und in der Aufrechterhaltung von allergischen Reaktionen (Lee et al., 2001). Diese Zellen sind auf Aktivierung und Überlebenssignale aus der Umgebung angewiesen. Zu diesen Mediatoren gehören auch die Neurotrophine, die ein verlängertes Überleben der Eosinophilen über die Neurotrophinrezeptoren Trk A und Trk B bewirken und so zum Fortbestehen der Krankheit beitragen (Nassenstein et al., 2003). Neben Fibroblasten und Myofibroblasten exprimieren auch Epithelzellen Neurotrophine in entzündeten Atemwegen- hierbei produzieren sie sogar den Hauptanteil an Neurotrophinen (Hahn et al., 2006). Könnte nun die Interaktion über Neurotrophine zwischen Epithelzellen, Fibroblasten / Myofibroblasten und Eosinophilen unterbunden werden, so könnte man die allergische Entzündung hemmen und den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. So haben Braun et al., 1998 gezeigt, dass anti-NGF den Einstrom von Eosinophilen in die Atemwege verhindern kann. Ferner konnten durch Blockade mit anti-NGF die beiden inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13, die sowohl von Eosinophilen als auch von Th₂-Zellen gebildet werden, gesenkt und in Folge davon die Atemwegsentzündung und die bronchiale Hyperreaktivität gemindert werden (Path et al., 2002).

Neben der Inhibierung der Neurotrophine könnte man auch Zytokine wie das TNF- α inhibieren, die zu einer verstärkten Neurotrophin-Expression in Fibroblasten / Myofibroblasten führen. Kim et al., 2006 wiesen nach, dass durch Inhibierung mit anti-TNF- α die Atemwegsentzündung und die Atemwegshyperreaktivität reduziert werden können.

Ein anderer Therapieansatz geht von den Neurotrophinrezeptoren aus. Man könnte mit Antikörpern die Rezeptoren blockieren- die spezifischen Trk-Rezeptoren sowie den niedrig-affinen p75-Neurotrophinrezeptor. Die Arbeitsgruppe Kerzel et al., 2003 hat gezeigt, dass Blockierung des p75-Neurotrophinrezeptors die Entzündung der Atemwege vermindert. Außerdem konnten Hahn et al., 2006 mit Hilfe des Tyrosinkinase-Inhibitors k252a die Überlebensfähigkeit von Eosinophilen reduzieren.

Zusätzlich könnte man auch versuchen, die Expression der Trk-Rezeptoren mittels siRNA zu unterbinden. Auch auf diesem Wege würde die Signalübertragung in die

Zellen nicht erfolgen und die typischen strukturellen und funktionellen Veränderungen der jeweiligen Erkrankung würden nicht ausgeprägt. Lommatzsch et al., 1999 haben für Epithelzellen, die keine p75- oder Trk-Rezeptoren exprimierten, zeigen können, dass Neurotrophine die Fähigkeit zur Stimulation von Zellwachstum oder Differenzierung in diesen Zellen verloren hatten.

Über die Inhibierung der freien Neurotrophine und die Blockierung der Neurotrophinrezeptoren könnte die immunologische Plastizität moduliert werden, die in einer verstärkten Entzündung der Atemwege mündet. Zum anderen könnte die neuronale Plastizität, die zu Atemwegshyperreaktivität führt, beeinflusst werden. Zusätzlich könnte auf diese Weise das airway remodeling beim Asthma bronchiale verhindert werden.

Die pathologischen Veränderungen beim allergischen Asthma bronchiale wie Atemwegshyperreaktivität, Entzündung und airway remodeling könnten auch durch Glukokortikoide vermieden werden. Wie Olgart and Frossard, 2001, Noga et al., 2001 und Hahn et al., 2006 dargestellt haben, senken Glukokortikoide die NGF- und BDNF-Sekretion und wirken so auf der Ebene der Neurotrophine. Die Neurotrophine haben somit keinen Effekt mehr auf die verschiedenen Zellen im Zuge der Entstehung und Erhaltung von chronischen Lungenerkrankungen. Ferner haben Chetta et al., 2003 gezeigt, dass Glukokortikoide auch die Anzahl an Fibroblasten und Myofibroblasten zu senken vermögen. Auf diese Weise würden einerseits die Neurotrophin-produzierenden Zellen in ihrer Zahl verringert, andererseits reduziert sich die Zahl der auf die Neurotrophine reagierenden Zellen. Ferner senken Glukokortikoide die Entzündung auf immunologischer Ebene und vermindern dadurch die Symptome der Lungenerkrankung. Dies also wären neue Möglichkeiten, in die Entwicklung und Progression des allergischen Asthma bronchiale einzugreifen und diese Erkrankungen zu behandeln.

Die Resultate dieser Dissertation beruhen auf In-vitro-Versuchen. Zwar sind die Ergebnisse und die sich daraus ergebenden Therapiemöglichkeiten hoffnungsvoll, aber diese Erkenntnisse müssen noch von klinischen Studien untermauert werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Chronische Lungenerkrankungen wie das allergische Asthma bronchiale sind schwere Erkrankungen mit steigender Prävalenz. Durch strukturellen und funktionellen Umbau wird das Lungengewebe irreversibel verändert. Das Immunsystem und auch das Nervensystem sind in die Pathomechanismen dieser Erkrankung involviert. Beide interagieren über verschiedene Mediatoren miteinander, zu denen auch die Neurotrophine zählen. Die vier Neurotrophine BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 schienen zunächst nur in Zusammenhang mit dem Nervensystem zu stehen, wo sie Entwicklung, Überleben und Tod von Neuronen beeinflussen. Nach neueren Erkenntnissen spielen sie aber auch eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen und haben zusätzlich Einfluss auf strukturelle Zellen wie Epithelzellen oder Fibroblasten / Myofibroblasten. Myofibroblasten differenzieren sich aus Fibroblasten nach Stimulation mit TGF- β 1 und finden sich vermehrt in den Atemwegen von chronisch Lungenkranken. Zusätzlich werden erhöhte Konzentrationen der oben genannten Neurotrophine bei Asthmatikern gemessen.

Aus diesem Grunde beschäftigt sich die vorliegende Dissertation mit dem Einfluss der Neurotrophine auf pulmonale Fibroblasten bzw. Myofibroblasten. Zunächst wurden Fibroblasten und Myofibroblasten bezüglich ihrer Neurotrophin- und Neurotrophinrezeptor-Expression untersucht. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Neurotrophin-Expression der Myofibroblasten. Im Hinblick auf die Neurotrophinrezeptoren konnten Übereinstimmungen für p75-Neurotrophinrezeptoren, Trk A- und Trk B-Rezeptoren gefunden werden. Bei Trk C dagegen fand sich eine unterschiedliche Expression zwischen Fibroblasten und Myofibroblasten.

Ferner wurden der Stoffwechsel und die Proliferation von pulmonalen Fibroblasten und Myofibroblasten miteinander verglichen. Dabei zeigte sich sowohl eine höhere Stoffwechselaktivität als auch eine stärkere Proliferationsrate in Myofibroblasten. Wurden die Zellen anschließend mit Anti-Neurotrophinen inhibiert, sank die Proliferation in Fibroblasten und Myofibroblasten. Die Stoffwechselaktivität dagegen blieb fast unverändert. Daraus resultiert eine Beteiligung der Neurotrophine an der

Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten. Ein Neurotrophin-Einfluss auf den Stoffwechsel dieser Zellen war aber kaum feststellbar.

Weiterhin wurde der Einfluss der Neurotrophine auf der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten anhand morphologischer Unterschiede untersucht. Dabei fand sich eine Beteiligung der Neurotrophine an der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Neurotrophine durch ihren Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zum Krankheitsgeschehen im allergischen Asthma bronchiale aktiv beitragen, woraus sich neue Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankung ergeben könnten.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L: The expanding role of NGF: from neurotrophic activity to immunologic diseases. *Allergy* 1997, 52: 883-94

American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165: 277-304

Antoniades HN, Bravo MA, Avila RE, et al.: Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990, 86: 1055-64

Arsalane K, Dubois CM, Muanza T, et al.: TGF- β 1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997, 17: 599-607

Awadh N, Muller N, Park C, Abboud R, and FitzGerald J: Airway wall thickness in patients with near fatal asthma and control groups: assessment with high resolution computed tomographic scanning. *Thorax* 1998, 53: 248-53

Barde YA, Davies AM, et al.: Brain derived neurotrophic factor. *Prog Brain Res* 1987, 71: 185-89

Bax B, Blaber M, Ferguson G et al.: Prediction of the three-dimensional structures of the nerve growth factor and epidermal growth factor binding proteins (kallikreins) and an hypothetical structure of the high molecular weight complex of epidermal growth factor with its binding protein. *Protein Sci* 1993, 2: 1229-41

Beeh KM, Beier J, Haas IC, et al.: Glutathione deficiency of the lower respiratory tract in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2002, 19: 1119-23

Black J: Airway Smooth Muscle in Asthma. *Asthma* 1997, 809-22

Böhm A, Aloe L, Levi-Montalcini R: NGF enhances precocious differentiation and numerical increase in mast cells in culture of rat splenocytes. *Accad Naz Lincei* 1986, 80: 1-6

Bokel C, Brown NH: Integrins in development: moving on, responding to and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell* 2002, 3: 311-21

Bonini S, Lambiase A et al.: Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic disease and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93: 10955-60

Bonini S, Lambiase A, Lapucci et al.: NGF and asthma. *Allergy* 2002, 57: 13-15

Borok Z, Gillissen A, Buhl R, et al.: Augmentation of functional prostaglandin E levels on the respiratory epithelial surface by aerosol administration of prostaglandin E. *Am Rev Respir Dis* 1991, 144: 1080-84

Bogatkevich GS, Tourkina E, Silver RM, et al.: Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependant pathway. *J Biol Chem* 2001, 276: 45184-92

Boushey HA: Bronchial hyperreactivity to sulfur dioxide: physiologic and political implications. *J Allergy Clin Immunol* 1982, 69: 335-38

Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al.: Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 1720-45

Braun A, Appel E, et al.: Role of NGF in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998, 28: 3240-51

Braun A, Nockher WA, Renz H: Neuro-immune interactions in the pathogenesis of bronchial asthma

Braun A, Nockher WA, Renz H: Control of nerve growth and plasticity. *Curr Opin Pharmacol* 2002, 2: 229-34

Braun A, Wiebe P, Pfeufer A, Renz H: Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substance P, NKA and NKB. *J Neuroimmunol* 1999, 97: 43-50

Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wilson J, Holgate ST, and Roche WR: Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990, 3: 507-11

Busse WW, Lemanske RF Jr: Asthma. *N Engl J Med* 2001, 344: 350-62

Cantin AM, Hubbard RC, Crystal RG: Glutathione deficiency in the epithelial lining fluid of the lower respiratory tract in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989, 139: 370-72

Cantin AM, North SL, Fells GA, et al.: Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin Invest* 1987, 79: 1665-73

Chao MV: Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4: 299-309

Chao MV, Bothwell M: Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002, 33: 9-12

Chapman BS, Kuntz ID: Modeled structure of the 75-kDa-neurotrophin receptor. *Protein Sci* 1995, 4: 1696-1707

Charbeneau RP, Christensen PJ, Chrisman CJ, et al.: Impaired synthesis of prostaglandin E2 by lung fibroblasts and alveolar epithelial cells from GM-CSF^{-/-} mice: implications for fibroproliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 284: 1103-11

Chetta A, Zanini A, et al.: Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167: 751-57

Chu H, Halliday J, Martin R, Leung D, Szeffler S, and Wenzel S: Collagen deposition in large airways may not differentiate severe asthma from milder forms of the disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158: 1936-44

Church, Arion: Simply Allergy (Paper muss ich nochmal suchen)

Coalson JJ: The ultrastructure of human fibrosing alveolitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1982, 395-99

Cockcroft DW: Airway responsiveness. *Asthma* 1997, 1253-66

Cohn L, Elias JA, Chupp GL: Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. *Annu Rev Immunol* 2004, 22: 789-815

Cohn L, Homer RJ, Marinov A, Rankin J, Bottomly K: Induction of airway mucus production by T helper 2 cells: a critical role for IL-4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 1997, 186: 1737-47

Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, et al.: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1988, 263: 6579-87

Cookson W. O., Moffatt M. F.: Genetics of asthma and allergy disease. *Hum Mol Genet* 2000, 9: 2359-64

Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB: T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1988, 1: 1129-32

Corrin B, Jagusch M, Dewar A, et al.: Fine structural changes in idiopathic pulmonary haemosiderosis. *J Pathol* 1987, 153: 249-56

Doucet C, Brouty-Boye D, et al.: IL-4 and IL-13 specially increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts. *Int Immunol* 1998, 10: 1421-33

Dugina V, Fontao L, Chapponier C, et al.: Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 2001, 114: 3285-96

Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, et al.: Matrilysin expression and function in airway epithelium. *J Clin Invest* 1998, 102: 1321-31

Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, et al.: Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90: 5423-27

Fox AJ, Patel HJ, Barnes PJ, Belvisi MG: Release of NGF by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 2001, 424: 159-62

Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM: Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res* 2001, 2: 90-101

Feng XH, Derynck R: Specificity and versatility in TGF- β signalling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21: 659-93

Finlay GA, Thannickal VJ, Fanburg BL, et al.: TGF- β 1-induced activation of the ERK pathway / activator protein-1 in human lung fibroblasts requires the autocrine induction of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 2000, 275: 27650-56

Freund V, Diop L, et al.: Neurotrophin receptors involved in the NGF-induced proliferation of airway smooth muscle cells. *Am J Resp Crit Care Med* 2003, 167: A 30

Freund V, Frossard N: Expression of NGF in the airways and its possible role in asthma. *Prog Brain Res* 2004, 146: 335-46

Freund V, Pons F, Joly V, et al.: Upregulation of NGF expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002, 20: 458-63

Frossard N, Freund V, Advenier C: Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004, 500: 453-65

Fukada Y, Basset F, Ferrans VJ, et al.: Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 1995, 26: 53-61

Fukada Y, Ishizaki M, Kudoh S, et al.: Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 1998, 78:687-98

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G, et al.: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971, 27: 549-50

Gallucci RM, Lee EG, Tomasek JJ: IL-6 modulates alpha-smooth muscle actin expression in dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *J Invest Dermatol* 2006, 126: 561-68

Giaid A, Michel RP, Stewart DJ, et al.: Expression of Endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993, 341: 1550-54

Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, et al.: H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signalling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* 1998, 111: 3209-20

Hahn C.: Die Rolle von IL-4 und IL-13 in Maus-Modellen für allergische Erkrankungen. Dissertation, 2003

Hahn C et al.: Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006, 117: 787-94

Hallbook F, Ibanez CF, Persson H: Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991, 6: 845-58

Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, et al.: TGF- β as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J Immunol* 2002, 168: 6470-78

Hamada A, Watanabe N et al.: NGF enhances survival and cytotoxic activity of human eosinophils. *Br J Haematol* 1996, 93: 299-302

Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, et al.: Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1996, 149: 1241-56

Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, et al.: Regulation of cell adhesion receptors by TGF- β . Concomitant regulation of integrins that share a common β 1 subunit. *J Biol Chem* 1989, 264: 380-88

Hikawa S, Kobayashi H, et al.: Expression of Neurotrophins and their receptors in peripheral lung cells of mice. *Histochem Cell Biol* 2002, 118: 51-58

Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Lipinski S, et al.: Differential monocyte chemoattractant protein-1 and Chemokine receptor-2 expression by murine lung fibroblasts derived from Th1- and Th2-type pulmonary granuloma models. *J Immunol* 1999, 163: 2193-201

Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, et al.: Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998, 54: 2152-59

Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde Ya: Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor / brain derived neurotrophic factor family. *Nature* 1990, 344: 339-41

Holgate ST, Peters-Golden M, Panettieri RA, et al.: Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111: 18-34

Holstein AF, Maekawa M, Nagano T, et al.: Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogeneous phenotype. *Arch Histol Cytol* 1996, 59: 109-25

Holt PG: Antigen presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 162: 151-156

Homer RJ, Elias JA: Consequences of long-term inflammation. Airway remodeling. *Clin Chest Med* 2000, 21: 331-43

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, et al.: Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993, 260: 547-49

Huang SK, Xiao HQ, Kleine-Tebbe J, Paciotti G, Marsh DG, et al.: IL-13 expression at the sites of allergen challenge in patients with asthma. *J Immunol* 1995, 155: 2688-94

Huebner K, Isobe M, Chao M, et al.: The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12 – 17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83: 1403-07

Huh JC, Strickland DH, Jahnsen FL, Turner DJ, Thomas JA, et al.: Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DC) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J Exp Med* 2003, 198: 19-30

Hunter DD et al.: NGF-induced phenotypic switch in guinea-pig airway sensory neurons. *Am J Resp Crit Care Med* 2000, 161: 1985-90

Ia Sala A, Corinti S, et al.: Ligand activation of NGF receptor Trk A protects monocyte from apoptosis. *J Leukoc Biol* 2000, 68: 104-10

Jarjour NN, Calhoun WJ, Kelly EA, et al.: The immediate and late allergic response to segmental bronchopulmonary provocation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 48: 23-39

Johnson RJ, Couser WG, Chi EY, et al.: New mechanism for glomerular injury. Myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *J Clin Invest* 1987, 79: 1379-87

Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, et al.: Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of TGF- β and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152: 2163-69

Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF: Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk protooncogene product induced by NGF. *Nature* 1991, 350: 158-60

Kassel O, De Blay , et al.: Local increase in the number of mast cells and expression of NGF in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhaled allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* 2001, 31: 1432-40

Katzenstein AL, Myers JL: Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am Crit Care Med* 1998, 157: 1301-15

Kerzel S, P ath G, Nockher WA, et al.: Pan Neurotrophin receptor p75 contributes to neuronal hyperreactivity and airway inflammation in a murine model of experimental asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28: 170-78

Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, et al.: TGF- β 1, but not TGF- β 2 or TGF- β 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, 14: 131-38

Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, et al.: Increased production and immunohistochemical localization of TGF- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991, 5: 155-62

Kim J, McKinley L et al.: Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholin hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by house dust. *Clin Exp Allergy* 2006, 36: 122-132

King TE Jr., Schwarz MI, Brown K, et al.: Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164: 1025-32

Kohyama T, Ertl RF, Valenti V, et al.: PG E2 inhibits fibroblast chemotaxis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001, 281: 1257-63

Kolodsick JE, Peters-Golden M, Larios J, et al.: PG E2 inhibits fibroblast to myofibroblast transition via E. prostanoid receptor 2 signaling and cyclic adenosine monophosphate elevation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29: 537-44

Kovacs EJ: Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1991, 12: 17-23

Kuhn C, Mason RJ: Immunolocalization of SPARC, tensin and thrombospondin in pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 1995, 147: 1759-69

Kuhn C, McDonald JA: The roles of the Myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 1991, 138: 1257-65

Kuhn C 3rd, Boldt J, King TE Jr., et al.: An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 1693-1703

Kung TT, Stelts D, Zurcher JA, Jones H, Umland SP, et al.: Mast cells modulate allergic pulmonary eosinophilia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995, 12: 404-9

Laitinen A, Laitinen LA, Virtanen IT: Bronchial Biopsies. *Asthma* 1997, 209-24

Lama V, Moore BB, Christensen P, et al.: PG E2 synthesis and suppression of fibroblast proliferation by alveolar epithelial cells is cyclooxygenase-2-dependant. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, 27: 752-58

Larios JM, Budhiraja R, Fanburg BL, et al.: Oxidative protein cross-linking reactions involving L-tyrosine in TGF- β 1-stimulated fibroblasts. *J Biol Chem* 2001, 276: 17437-41

Lavrentiadou SN, Chan C, Kawcak T, et al.: Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells is regulated by glutathione. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 25: 676-84

Lawrence T, Gilroy DW, et al.: Possible new role for NF-kappa B in the resolution of inflammation. *Nat Med* 2001, 7: 1291-97

Lee JJ, McGarry MP, Farmer SC, Denzler KL, Larson KA, et al.: IL-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med* 1997, 185: 2143-56

Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ: Pulmonary T-cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology? *J Allergy Clin Immunol* 2001, 107: 945-57

Levi-Montalcini R, Dal Toso R, et al.: Update of the NGF saga. *J Neurosci* 1995, 130: 119-127

Lewin GR, Barde YA: Physiology of Neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996, 19: 289-317

Lommatzsch M, Braun A, et al.: Abundant production of BDNF by adult visceral epithelia. *Am J Pathol* 1999, 155: 1183-93

Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, et al.: Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2001, 17: 180-89

Martin P: Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997, 276: 75-81

Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, et al.: Exaggerated spontaneous release of PDGF by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1987, 317: 202-09

Matsuda H, Kannan Y, et al.: NGF induces development of connective tissue-type mast cells in vitro from murine bone marrow cells. *J Exp Med* 1991, 174: 7-14

Matsuda H, Koyama H, et al.: Role of NGF in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *J Exp Med* 1998, 187: 297-306

Mattes J, Yang M, Mahalingam S, Kuehr J, Webb DC, et al.: Intrinsic defect in T cell production of IL-13 in the absence of both IL-5 and Eotaxin precludes the development of eosinophilia and airway hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med* 2002, 195: 1433-44

Matzinger P: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002, 296: 301-05

McGowan SE: Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair. *FASEB J* 1992, 6: 2895-2904

Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, et al.: Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines and Myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000, 57: 147-58

Micera A, Vigneti E, et al.: NGF 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* 2001, 98: 6162-67

Mio T, Liu XD, Adachi Y, et al.: Human bronchial epithelial cells modulate collagen gel contraction by fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998, 274: 119-26

Mosman TR, Cherwinski H, Bond MW, et al.: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986, 136: 2348-57

Nagakawa T et al.: BDNF regulates Glucose metabolism by modulating energy balance in diabetic mice. *Diabetes* 2000, 49: 436-44

Nassenstein C., Braun A. et al.: 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* 2003, 198: 455-67

Nash JR, McLaughlin PJ, Butcher D, et al.: Expression of TNF-alpha in cryptogenic fibrosing alveolitis. *Histopathology* 1993, 22: 343-47

Nicholson AG, Fulford LG, Colby TV, et al.: The relationship between individual histologic features and disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166: 173-77

Nilsson G, Forsberg-Nilsson K, et al.: Human mast cells express functional Trk A and are source of NGF. *Eur J Immunol* 1997, 27: 2295-2301

Nithya M, Suguna L, Rose C: The effect of NGF on the early responses during the process of wound healing. *Biochem Biophys Acta* 2003, 1620: 25-31

Nockher WA, Renz H: Neurotrophins in clinical diagnostics: pathophysiology and laboratory investigation. *Clinica Chimica Acta* 2005, 352: 49-74

Nockher WA, Renz H: Neurotrophins in inflammatory lung disease: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003, 14: 559-78

Oddy W. H., Holt P.G. et al.: Association between breast feeding and asthma in 6 year old children: findings of a prospective birth cohort study. *BMJ* 1999, 319: 815-19

Olgart C, Frossard N: Human lung fibroblasts secrete NGF. Effect of inflammatory cytokines and glucocorticoides. *Eur Respir J* 2001, 18: 115-21

Olgart-Höglund C, Frossard N: NGF and asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2002, 15: 51-60

Olgart-Höglund C, De Blay F, et al.: NGF levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur Respir J* 2002, 20: 1110-16

Ouyang RY, Hu CP, et al.: Changes of NGF and its receptors in the lung tissues in asthmatic rats and their effects on the airway inflammation. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005, 30: 660-65

Pardo A, Ridge K, Uhal B, et al.: Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinase A and B in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 1997, 29: 901-10

Parks WC, Shapiro SD: Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res* 2001, 2: 10-19

Parronchi P, De Carli M, Manetti R, et al.: IL-4 and IFN alpha and gamma exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 1992, 149: 2977-83

Path G, Braun A et al.: Augmentation of allergic early-phase reaction by NGF. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166: 818-26

Pattarawarapan M, Burges K: Molecular basis of Neurotrophin-receptor interactions. *J Med Chem* 2003, 46: 5277-91

Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994, 76: 241-51

Phan SH: Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008, 5: 334-337

Phan SH: The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 2002, 122: 286-89

Phan SH, Zhang K, Zhang HY, et al.: The myofibroblast as an inflammatory cell in pulmonary fibrosis. *Curr Top Pathol* 1999, 93: 173-82

Pohunek P, Roche WR, Trzikova J, Kurdmann J, Warner JO: Eosinophilic inflammation in the bronchial mucosa in children with bronchial asthma. *Eur Respir J* 2000, 11: 160s

Raats CJ, Bakker MA, van den Born J, et al.: Hydroxyl radicals depolymerize glomerular heparan sulfate in vitro and in experimental nephrotic syndrome. *J Biol Chem* 1997, 272: 26734-41

Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, et al.: Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001, 24: 591-98

Rankin JA, Picarella D, Tarallo A, DiCosmo B, Whitsett JA, et al.: In vivo effects of the overexpression of IL-4 in the lungs of transgenic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149: 1071a

Raychaudhuri S.K et al.: Effect of NGF and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Arch Dermatol Res* 2001, 293: 291-95

Renz H: The role of Neurotrophins in bronchial asthma. *Eur J Pharmacol* 2001, 429: 231-37

Ricciardolo FL, Di Stefano A, van Krieken JH, et al.: Proliferation and Inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2003, 33: 905-11

Riedler J. et al.: Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 2001, 358: 1129-33

Roberts CR, Okazawa M, Wiggs B, Pare P: Airway Wall Thickening. *Asthma* 1997, 925-36

Rochat T: Is intrinsic or non-atopic asthma a particular disease? *Rev Med Suisse* 2005, 16; 1 (41): 2640-3

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989, 1: 520-24

Rothenberg ME: Eosinophilia. *N Engl J Med* 1998, 338: 1592-600

Roux PP, Barker PA: Neurotrophin signalling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 2002, 67: 203-33

Sacco O, Romberger DJ, et al.: Spontaneous production of TGF- β by primary cultures of bronchial epithelial cells: effects on cell behaviour in vitro. *J Clin Invest* 1992, 90: 1379-85

Sacco O, Silvestri M, et al.: Epithelial cells and fibroblasts: structural repair and remodelling in the airways. *Paediatric Respir Rev* 2004, 5: 35-40

Schmitt E, Van Brandwijk R, Fischer HG, Rude E: Establishment of different T cell sublines using either IL-2 or IL-4 as growth factors. *Eur J Immunol* 1990, 20: 1709-15

Selman M, Ruiz V, Cabrera S, et al.: TIMP-1, -2, -3 and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing non-degradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279: 562-74

Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, et al.: The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by TGF- β 1. *J Cell Biol* 1998, 142: 873-81

Shahar I, Fireman E, Topilsky M, et al.: Effect of Endothelin-1 on alpha-smooth muscle actin expression and on alveolar fibroblasts proliferation in interstitial lung diseases. *Int J Immunopharmacol* 1999, 21: 759-75

Shi HZ, Humbles A, Gerard C, Jin Z, Weller PF: Lymph node trafficking and antigen presentation by endothelial eosinophils. *J Clin Investig* 2000, 105: 945-53

Singer AJ, Clark RA: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999, 341: 738-46

Solomon A, Aloe L, et al.: NGF is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 1998, 102: 454-60

Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, 17: 463-516

Strachan D. P.: Hay fever, hygiene and household size. *BMJ* 1989, 299: 1259-60

Susaki Y et al.: Functional properties of murine macrophages promoted by NGF. *Blood* 1996, 88: 4630-37

Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA: Expression of IL-9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998, 188: 1307-20

Thannickal VJ, Aldweib KD, Fanburg BL: Tyrosine phosphorylation regulates H₂O₂ production in lung fibroblasts stimulated by TGF- β 1. *J Biol Chem* 1998, 273: 23611-15

Thannickal VJ, Aldweib KD, Rajan T, et al.: Upregulated expression of fibroblast growth factor receptors by TGF- β 1 mediates enhanced mitogenic responses to FGF's in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 251: 437-41

Thannickal VJ, Lee DY, White ES, et al.: Myofibroblast differentiation by TGF- β 1 is dependant on cell adhesion and integrin signalling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2003, 278: 12384-89

Thannickal VJ, Toews GB, White ES, et al.: Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004, 55: 395-417

Thorpe LW, Peres-Polo JR: The influence of NGF on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes. *J Neurosci Res* 1987, 18: 134-9

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al.: Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodelling. *Natl Rev Mol Cell Biol* 2002, 3: 349-63

Tschumperlin DJ, Shively JD, Kikuchi T, Drazen JM: Mechanical stress triggers selective release of fibrotic mediators from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 28: 142-49

Vaughan M, Howard E, Tomasek J: TGF- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Research* 2000, 257: 180-89

Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Brraun A: Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158: 2002-2005

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al.: TGF- β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, 84: 5788-92

Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K: Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991, 88: 935-42

Walker GA, Guerrero IA, Leinwand LA: Myofibroblasts: molecular crossdressers. *Curr Top Dev Biol* 2001, 51: 91-107

Wang R, Zagariya A, Ang E, et al.: Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1999, 277: 1245-50

Wenzel SE, Fowler AA 3rd, Schwartz LB: Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and Tryptase in atopic subjects with and without asthma. *Am Rev Respir Dis* 1988, 137: 1002-08

White SR: Epithelium as a target. *Asthma* 1997, 875-900

Wiesmann C, Ultsch MH, et al.: Crystal structure of NGF in complex with ligand-binding domain of Trk A receptor. *Nature* 1999, 401: 184-88

Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, et al.: Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *Clin Invest* 1995, 95: 1861-68

Wilson J and Li X: The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy* 1997, 27: 363-371

Wright JK, Cawston TE, Hazleman BL: TGF- β stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by human synovial and skin fibroblasts. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1094: 207-10

Zhang HY, Phan SH: Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor β_1 . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, 21: 658-65

Zhu Z, Homer R, Wang Z, Chen Q, Geba G, et al.: Transgenic expression of IL-13 in murine lung causes airway inflammation, mucus hypersecretion, subendothelial fibrosis, physiologic abnormalities, eotaxin production and airway hyperresponsiveness to methacholine. *J Clin Invest* 1999, 103: 779-88

Zuany-Amorim C, Ruffie C, Haile S, Vargaftig BB, Pereira P, Pretolani M: Requirement for gamma delta T cells in allergic airway inflammation. *Science* 1998, 280: 1265-6

VIII. ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreaktivität
AIP	akute interstitielle Pneumonie
α -SMA	α -smooth muscle actin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	Bromodesoxyuridin
CD-4 ⁺	cluster of differentiation-4 positiv
cDNA	complementary DANN
COP	cryptogene organisierende Pneumonie
DC	dendritische Zelle
DIP	desquamative interstitial pneumonia
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsRNA	double stranded RNA
DTT	dithiothreitol
ECP	eosinophil cationic protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	Eosinophilen-Peroxidase
Fc ϵ R-?	Fc ϵ Rezeptor-?
FCS	fetales Kälberserum

FVBN	bestimmter Mäusestamm
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GSH	Glutathion
h	Stunde
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HRP-Konjugat	horse radish peroxidase
IFN- γ	Interferon- α
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IIP	idiopathische interstitielle Pneumonie
IL-?	Interleukin-?
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis
kDa	kiloDalton
k252a	niedermolekularer Tyrosinkinase-Inhibitor
LIP	lymphoide interstitielle Pneumonie
mAb	monoclonal antibody
MBP	major basic protein
MCH-II	major histo-compatibility complex class II
MEM	minimal essential medium
MLg	bestimmte Fibroblasten-Linie
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	messenger RNA
NaPuruvat	Natrium-Pyruvat
NEAA	non essential amino acids
NGF	nerve growth factor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffoxid
NSIP	nicht spezifische interstitielle Pneumonie
NT-?	Neurotrophin-?
NT-R	Neurotrophin-Rezeptor
pAb	polyclonal antibody

PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PenStrep	Penicillin + Streptomycin
PGE	Prostaglandin E
p75	niedrig-affiner Neurotrophin-Rezeptor
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (Chemokin)
RB-ILD	respiratory bronchiolitis interstitial lung disease
RLT	Zellysepuffer
rlu / s	relative light units / second
RPE	Zellysepuffer
RSV	respiratory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
RW1	Zellysepuffer
s	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
Smad3	Mothers against decapentaplegic homolog 3 (Modulator von TGF- β -Signalen)
TGF- β 1	transforming growth factor- β 1
Th-?-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIMP	tissue inhibitors of matrix metalloproteinase
TMB	Gelpuffer
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Trk-?	tropomyosin-related kinase-? (hoch-affiner Neurotrophin-Rezeptor)
T _{Reg}	regulierende T-Zelle
UIP	usual interstitial pneumonia

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Unterschiedliche Reaktionen der Atemwege auf ein Allergen im Vergleich zwischen Gesunden und Asthmatikern.
→ S. 8
- Abbildung 2: Die Differenzierung der Th₁-, Th₂- und der Th₃-Zelle aus einer gemeinsamen Vorstufe, der Th₀-Zelle.
→ S. 9
- Abbildung 3: Allergische Reaktion.
→ S. 11
- Abbildung 4: Strukturelle Veränderungen des Bronchialsystems im Asthma.
→ S. 13
- Abbildung 5: Bidirektionale Interaktion von Neurotrophinen und unterschiedlichen Körperzellen.
→ S. 16
- Abbildung 6: Neurotrophine und ihre Neurotrophin-Rezeptoren.
→ S. 17
- Abbildung 7: Die Signal-Transduktions-Kaskade des p75-Neurotrophin-Rezeptors.
→ S. 18
- Abbildung 8: Neurotrophine modulieren die neuronale und immunologische Plastizität in allergischer Lungenentzündung.
→ S. 20
- Abbildung 9: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophin-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten.
→ S. 39
- Abbildung 10: BDNF-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen.
→ S. 40
- Abbildung 11: NGF-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen.
→ S. 41

- Abbildung 12: NT-3-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen.
→ S. 42
- Abbildung 13: NT-4-Konzentrationen in Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitintervallen.
→ S. 43
- Abbildung 14: BDNF-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen.
→ S. 44
- Abbildung 15: NGF-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen.
→ S. 45
- Abbildung 16: NT-3-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen.
→ S. 46
- Abbildung 17: NT-4/5-Konzentrationen in primären Fibroblasten und Myofibroblasten nach bestimmten Zeitabständen.
→ S. 47
- Abbildung 18: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten.
→ S. 49
- Abbildung 19: Graphische Darstellung der PCR-Ergebnisse der Neurotrophinrezeptor-Expression in Fibroblasten und Myofibroblasten.
→ S. 50
- Abbildung 20: Darstellung der Stoffwechselaktivität von Fibroblasten und Myofibroblasten ohne und mit Inhibierung durch Anti-Neurotrophine nach bestimmten Zeitintervallen.
→ S. 51
- Abbildung 21: Zellproliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten und ihre Inhibition mit Anti-Neurotrophinen.
→ S. 53

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg und Giessen:

- Adamkiewicz
- Aumüller
- Bals
- Basler
- Baum
- Becker
- Boudriot
- Christiansen
- Eilers
- Feuser
- Gerdes
- Görg
- Gotzen
- Grimm
- Griss
- Grundmann
- Grzeschik
- Gudermann
- Hertl
- Hofmann
- Jungclas
- Kann
- Koolmann
- Krieg
- Kroll
- Lang
- Lenz
- Lill
- Maier
- Maisch
- Mandrek
- Moll
- Müller
- Mutters
- Neubauer
- Oertel
- Radsak
- Renz
- Richter
- Schäfer
- Schmidt
- Schrader
- Seitz
- Wagner
- Weiler
- Werner
- Westermann
- Wulf

Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Johanna Napierala
Geburtsdatum: 03.11.1981
Geburtsort: Langenbielau
Privatadresse: Herler Straße 74-76
51067 Köln
Tel.: 0221-4234 8331
Email-Adresse: johanna.napi@gmx.de

Schulbildung

1988 – 1992 Grundschole Neustadt / Hessen
1992 – 2001 Schwalmgymnasium Schwalmstadt-Treysa
Abschluss: Abitur (Note: 1,0)

Studium

2001 – 2008 Studium der Humanmedizin an der Philipps-
Universität Marburg (Endnote: 1,5)
Nov. 2004 Beginn der Promotion in der Abteilung für Klinische
Chemie und Molekulare Diagnostik (Prof. Dr. Renz)

Beruflicher Werdegang

Seit September 2008 Assistenzärztin in der Gynäkologie und Geburtshilfe im
Heilig Geist-Krankenhaus in Köln

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die in dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel **„Einfluss der Neurotrophine auf Proliferation, Stoffwechsel und Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale“** in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Universitätsklinikums Marburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Renz ohne Hilfe Dritter selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Arbeit angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 21.11.2008

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Renz angefertigt.

Herrn Prof. Harald Renz möchte ich für die Möglichkeit danken, die Dissertationsarbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Nockher, der durch seine sehr hilfreiche Unterstützung v.a. bei der Fertigstellung dieser Arbeit erheblich zum Gelingen beigetragen hat.

Vielen Dank an Herrn Dr. Christian Hahn für die stete Diskussionsbereitschaft, sein Interesse und die ausgezeichnete Betreuung im Labor.

Frau Stefanie Achenbach möchte ich an dieser Stelle für die geduldige und kompetente Einführung und exzellente technische Unterstützung danken, ohne die eine solche experimentelle Arbeit nur unter viel schwierigeren Umständen möglich gewesen wäre.

Frau Henriette Scholz vielen Dank für die gute Kooperation innerhalb der an dieser Arbeit beteiligten Projekte.

Frau Anja Spies sei gedankt für die ewige Hilfsbereitschaft im Labor. Genauso möchte ich den übrigen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern unseres Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Meinen Freunden Anna Junge, Henriette Scholz, Michele Germann, Alana und Christian Klossek danke ich für die notwendige Unterstützung, die mir während der Arbeit so manchmal nötig war.

Einen ganz herzlichen Dank möchte ich meinem Partner Sebastian Stephan an dieser Stelle aussprechen, der mich insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit hilfreich und ausdauernd begleitet hat.

Meine größte Dankbarkeit gebührt jedoch meinen Eltern Krystyna und Waldemar, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und mir stets geduldig und verständnisvoll zur Seite gestanden haben.

DANKE !