

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik
des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Renz

Nerve Growth Factor (NGF): ein pro-fibrotischer Faktor im Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. rer. physiol.)



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

AYŞE KILIÇ
aus Kehl/Rhein

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 10.05.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. H. Renz

Korreferent: Prof. Dr. U. Steinhoff

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG..... 8

1.1 ASTHMA BRONCHIALE 8

 1.1.1 *Immunpathogenese und Pathophysiologie* 9

 1.1.2 *Histopathologische Veränderungen in chronisch entzündeten Atemwegen - Airway Remodeling*..... 12

1.2 BEEINTRÄCHTIGUNG DER LUNGENFUNKTION VERURSACHT DURCH *AIRWAY REMODELING* 13

1.3 PATHOPHYSIOLOGIE DER FIBROSEENTSTEHUNG 14

 1.3.1 *Fibroblasten* 17

 1.3.2 *Kollagene*..... 18

1.4 NEUROTROPHINE..... 19

 1.4.1 *Neurotrophinrezeptoren*..... 19

 1.4.2 *Neurotrophine in der allergischen Atemwegsentszündung*..... 22

 1.4.3 *NGF in der Wundheilung* 23

1.5 ZIELSETZUNG 24

2. MATERIAL UND METHODEN 26

2.1 VERSUCHSTIERE 26

2.2 ZELLEN 26

 2.2.1 *Eukaryotische Zellen* 26

 2.2.2 *Prokaryotische Zellen* 26

2.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 26

2.4 KITS..... 27

2.5 NUKLEINSÄUREN 28

 2.5.1 *Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere* 28

 2.5.2 *Primersequenzen zur Generierung der Promotorfragmente* 28

 2.5.3 *Primer für mRNA Expressionsuntersuchungen (murin)* 29

 2.5.4 *small interfering RNA*..... 29

 2.5.5 *Vektoren* 29

 2.5.6 *Nukleinsäure Standards* 29

2.6 PROTEINE 29

 2.6.1 *rekombinante Proteine* 29

 2.6.2 *Primärantikörper* 30

 2.6.3 *Sekundärantikörper* 30

 2.6.4 *Enzyme*..... 30

 2.6.5 *Proteinstandards*..... 31

2.7 LÖSUNGEN, NÄHRMEDIEN UND PUFFER 31

 2.7.1 *Lösungen*..... 31

 2.7.2 *Nährmedien für Säugerzellen*..... 31

 2.7.3 *Nährmedien für Bakterien*..... 31

2.7.4 Puffer	31
2.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	33
2.9 GERÄTE	33
2.10 SOFTWARE.....	34
2.11 VERSUCHSTIERE UND BEHANDLUNGSPROTOKOLLE	34
2.11.1 Mausstämme	34
2.11.2 Modell zur Induktion einer chronisch allergischen Atemwegsentzündung.....	35
2.11.3 Neutralisierung von NGF im Maus-Modell	35
2.12 INVASIVE MESSUNG DER LUNGENFUNKTION.....	36
2.12.1 Bestimmung des Atemwegwiderstands und der Lungencompliance.....	36
2.13 PROBENGEWINNUNG AUS VERSUCHSTIEREN.....	37
2.13.1 Serumgewinnung.....	37
2.13.2 Probengewinnung aus der broncho- alveolären Lavage.....	37
2.13.2.1 BAL- Flüssigkeit.....	37
2.13.2.2 Bestimmung der Zellzahl in der BAL.....	37
2.13.2.3 Herstellung von Zytospins	38
2.13.3 Organpräparation, Einbettung und Herstellung der Lungenschnitte	38
2.13.3.1 Organpräparation.....	38
2.13.3.2 Herstellung der Lungenschnitte	38
2.14 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	39
2.14.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung	39
2.14.2 Periodic-Acid Schiff Färbung.....	39
2.14.3 Färbung von fibrillärem Kollagen.....	39
2.14.4 Immunhistochemie.....	40
2.15 QUANTIFIZIERUNG DER SUBEPITHELIALEN KOLLAGENSCHICHT	40
2.16 ZELLKULTUREN	41
2.16.1 Isolierung primärer Fibroblasten aus der Mauslunge	41
2.16.1.1 Subkultivierung primärer Fibroblasten	42
2.16.1.2 Stimulationsbedingungen für mRNA Expressionsuntersuchungen.....	42
2.16.1.3 Kulturbedingungen für proteinbiochemische Untersuchungen	42
2.16.1.4 Kulturbedingungen zur Bestimmung der Zellvitalität.....	43
2.16.2 Humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK293).....	43
2.16.2.1 Kulturbedingungen für proteinbiochemische Untersuchungen	43
2.16.2.2 Kulturbedingungen zur Bestimmung der Luziferaseaktivität	43
2.16.2.3 Kulturbedingungen zur Bestimmung der Zellvitalität.....	44
2.17 PROTEINBIOCHEMIE	44
2.17.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	44
2.17.1.1 Nachweis OVA-spezifischer Immunglobuline	44
2.17.1.2 Zytokin- Konzentrationsbestimmung in BALF und Gewebe.....	45
2.17.2 Protein- Isolation.....	45
2.17.3 Protein- Fällung und Konzentrationsbestimmung	45
2.17.4 Immunpräzipitation	46
2.17.5 SDS-Page und Immunoblotting	46

2.18 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	47
2.18.1 RNA-Interferenz (RNAi)	47
2.18.2 RNA- Isolierung, DNA- Verdau und Erststrang copy-DNA Synthese.....	47
2.18.3 Quantitative Real-Time Polymerase- Ketten- Reaktion (RT-PCR)	48
2.18.4 DNA- Isolierung und Genotypisierung von Mäusen	49
2.18.5 Generierung der Kollagen 3- Promotorfragmente	50
2.18.5.1 Amplifizierung der zu untersuchenden Genabschnitte.....	50
2.18.5.2 Aufreinigung des PCR-Produktes	50
2.18.5.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	50
2.18.5.4 TA Klonierung	50
2.18.5.5 Ligation	51
2.18.5.6 Transformation chemisch kompetenter E.coli	52
2.18.6 Plasmidpräparation.....	52
2.18.6.1 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab	52
2.18.6.3 Plasmidpräparation in großem Maßstab	52
2.18.7 Sequenzierung der Promotorfragmente	53
2.18.8 Transiente Transfektion	53
2.18.9 Bestimmung der Luziferase- Aktivität.....	53
2.19 BESTIMMUNG DER ZELLVITALITÄT	54
2.20 STATISTISCHE ANALYSEN	54
3. ERGEBNISSE	55
3.1 KINETIK DER NGF-SPIEGEL IN DER ALLERGISCHEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG <i>IN VIVO</i>	55
3.1.1 <i>Erhöhte NGF-Spiegel begleitend zu strukturellen Veränderungen in der chronisch allergisch entzündeten Lunge</i>	55
3.2 EINFLUSS VON NGF AUF DIE KOLLAGEN-III- EXPRESSION <i>IN VITRO</i>	58
3.2.1 <i>NGF induziert die Kollagen-III- Expression in Lungenfibroblasten</i>	58
3.3 AUSWIRKUNGEN DER NGF- NEUTRALISIERUNG AUF DIE SUBEPITHELIALE FIBROSIERUNG IN DER CHRONISCH ALLERGISCHEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG <i>IN VIVO</i>	59
3.3.1 <i>Die systemische Neutralisierung beeinflusst nicht die Antigen- spezifische Antikörperproduktion</i>	59
3.3.2 <i>Verminderte Fibrosierung der Atemwege nach systemischer anti-NGF Applikation</i>	61
3.3.3 <i>Die chronische Atemwegsentzündung wird durch systemische anti-NGF- Gabe unterdrückt</i>	63
3.4 AUSWIRKUNG EINER KONSTITUTIVEN NGF-EXPRESSION IN DER LUNGE <i>IN VIVO</i>	65
3.4.1 <i>Verstärkte Kollagenablagerung in den Atemwegen durch lokale NGF- Überexpression</i>	66
3.4.2 <i>Beeinträchtigung der Lungenphysiologie durch strukturelle Veränderungen in NGF- Tg Mäusen</i>	68
3.5 AUSWIRKUNG DER KONSTITUTIVEN NGF-EXPRESSION AUF DIE FIBROSIERUNG IN CHRONISCH ENTZÜNDETEN ATEMWEGEN <i>IN VIVO</i>	69

3.5.1 Die konstitutive NGF-Expression führt zu keiner Steigerung der Kollagenablagerung in chronisch entzündeten Atemwegen.....	69
3.6 ROLLE DES NGF-REZEPTORS P75 ^{NTR} BEI DER NGF- INDUZIERTEN KOLLAGENEXPRESSION	71
3.6.1 Knock- out des p75 ^{NTR} beeinträchtigt nicht die NGF- induzierte Kollagen III- Expression in vitro	71
3.6.2 Rolle des NGF- Rezeptors p75 ^{NTR} bei der subepithelialen Kollagenablagerung in vivo	72
3.7 ROLLE DES NGF-REZEPTORS TRKA BEI DER KOLLAGENEXPRESSION	75
3.7.1 TrkA-Signalwege aktivieren die Kollagen III Transkription in vitro	75
3.7.2 NGF induziert die Kollagen III Expression in primären Lungenfibroblasten über die p38 MAPK.....	80
3.8 TGFβ1- ABHÄNGIGKEIT DER NGF- INDUZIERTEN KOLLAGENEXPRESSION	82
3.8.1 NGF aktivierte p38 MAPK zur Kollagen III- Induktion mündet nicht in den TGFβ1/SMAD- Signalweg in vitro.....	82
3.8.2 NGF-Tg Mäuse weisen keine erhöhten TGFβ1- Konzentrationen auf.....	84
4. DISKUSSION	86
5. SUMMARY	105
6. ZUSAMMENFASSUNG	106
7. LITERATURVERZEICHNIS	107
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	119
9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	123
10. VERÖFFENTLICHUNGEN & KONGRESSBEITRÄGE.....	124
11. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	126
12. CURRICULUM VITAE.....	127
13. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	128
DANKSAGUNG	129

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale stellt eine heterogene chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege dar. Die unterschiedlichen Phänotypen manifestieren sich jedoch ähnlich und sind durch anfallsweise auftretende Atemnot gekennzeichnet. Das Asthma bronchiale wird aufgrund seiner Ätiologie in atopisch (extrinsisch) und nicht-atopisch (intrinsisch) unterteilt. Im Zuge der Arbeit wird nur auf das atopische Asthma eingegangen.

Bei atopischen Erkrankungen neigt der Organismus, aufgrund einer genetischen Prädisposition, dazu, auf einen Allergen-Kontakt hin, mit einer Immunglobulin (Ig) E-vermittelten Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I zu reagieren. Atopiker weisen neben Allergen-spezifischen IgE Antikörpern im Serum einen erhöhten Gesamt-IgE-Spiegel sowie eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut auf (Cookson and Moffatt, 2004).

Allen allergischen Krankheitsbildern gemein ist der Anstieg ihrer Prävalenz innerhalb der letzten Dekaden, vor allem in industrialisierten Ländern. Während durch die verbesserte medizinische Versorgung und dem erhöhten Hygienestandard Infektionskrankheiten vermindert wurden, kann ein deutlicher Anstieg der Allergien in der Bevölkerung beobachtet werden. Der Entstehung atopischer Erkrankungen wird ein komplexes Zusammenspiel genetischer und Umwelt-Einflüsse zugrunde gelegt. Die genetische Prädisposition wird neben der früh-kindlichen Infektion mit Viren (Lemanske, Jr. et al., 2005) aber auch der mangelhaften/fehlenden Programmierung des Immunsystems im frühen Kindesalter (Romagnani, 2004; von Mutius E. and Vercelli, 2010) als Ursache für die Entstehung allergischer Erkrankungen angesehen.

Einst nur als Manifestation wiederkehrender Bronchospasmen und erhöhter Schleimproduktion angesehen, belegen heutige Erkenntnisse eindeutig die direkte Abhängigkeit der episodisch auftretenden Symptome von einer persistierenden Atemwegsentzündung und strukturellen Veränderungen in den Atemwegen. Sowohl im Schweregrad der Atemwegsentzündung als auch im Ausmaß der strukturellen Veränderungen sind individuelle Unterschiede bei Patienten zu beobachten. In ähnlicher Weise unterscheiden sich diese auch im klinischen Verlauf der Erkrankung. Weshalb bei einigen Patienten die Erkrankung persistiert und bei anderen weiter voranschreitet ist nicht geklärt. Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Erkrankung, die auslösenden Faktoren der chronischen Entzündung und der strukturellen

Veränderungen, sowie das Zusammenspiel der histopathologischen Veränderungen im Asthma sind bisher kaum definiert.

1.1.1 Immunpathogenese und Pathophysiologie

Die allergische Entzündungsreaktion in der Lunge wird durch Aero-Allergene, wie Hausstaubmilbenkot, Birken- und unterschiedliche Gräser- Pollen, ausgelöst. Charakteristische Symptome sind die periodisch auftretenden Atemwegsobstruktionen, welche zur erschwerten Atmung, bis hin zum Tod durch Ersticken, führen können. Sie werden durch die allergische Entzündungsreaktion, welche eine Überempfindlichkeitsreaktion des Typ 1 darstellt, ausgelöst. Die grundlegenden Mechanismen zur Entstehung der Symptome sollen im Folgenden beschrieben werden.

Sensibilisierung

Der Etablierung einer allergischen Entzündung in den Atemwegen geht die Sensibilisierung eines Individuums gegen ein Allergen voraus. In dieser Phase phagozytieren professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC), hier handelt es sich um unreife intraepitheliale dendritischen Zellen (DC), ein eigentlich harmloses Antigen (Ag), prozessieren dieses und migrieren als reife Zellen in die T-Zellzonen der drainierenden Lymphknoten. Dort präsentieren DCs naiven T- Zellen (T_H0) Ag-Fragmente über das *major histocompatibility complex* (MHC)- II Molekül (Liu et al., 2001). Die Aktivierung der T_H0 -Zellen und ihre Differenzierung zur T_H2 -Zelle erfolgt durch die Erkennung des MHC-II Moleküls durch den T-Zell- Rezeptor (TCR) und der Interaktion des kostimulatorischen Moleküls B7-2 auf APCs mit dem T-Zell-Molekül CD28 (Galli et al., 2008; Lohoff and Mak, 2005). Die selektive Differenzierung zur T_H2 -Zelle ist hierbei vom Vorhandensein von Interleukin (IL)-4 abhängig (Lohoff and Mak, 2005). Aktivierte T_H2 - Zellen sezernieren als charakteristische Markerzytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 und *granulocyte macrophage- colony stimulating factor* (GM-CSF) (Romagnani, 2000). In der Phase der Sensibilisierung nehmen IL-4 und IL-13 eine zentrale Rolle ein. Beide Zytokine sind zum einen für die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2 - Zellen unerlässlich, zum anderen bewirken Sie in aktivierten B-Zellen den Isotyp- Klassenwechsel von IgM zu IgE. Als Folge resultiert die erhöhte Produktion allergenspezifischer IgE-AK, welche nach kurzzeitiger Zirkulation durch IgE-Rezeptoren (Fcε Rezeptor I [FcεRI]) auf Immun- Effektorzellen, wie Mastzellen, gebunden werden (Galli et al., 2008). In dieser Phase zeigen sich keinerlei Symptome.

Effektorphase

Ist das Immunsystem gegen ein Allergen sensibilisiert wird bei erneutem Allergenkontakt die allergische Entzündungsreaktion, welche sich in eine Früh- und eine Spätphasereaktion unterteilen lässt, gestartet.

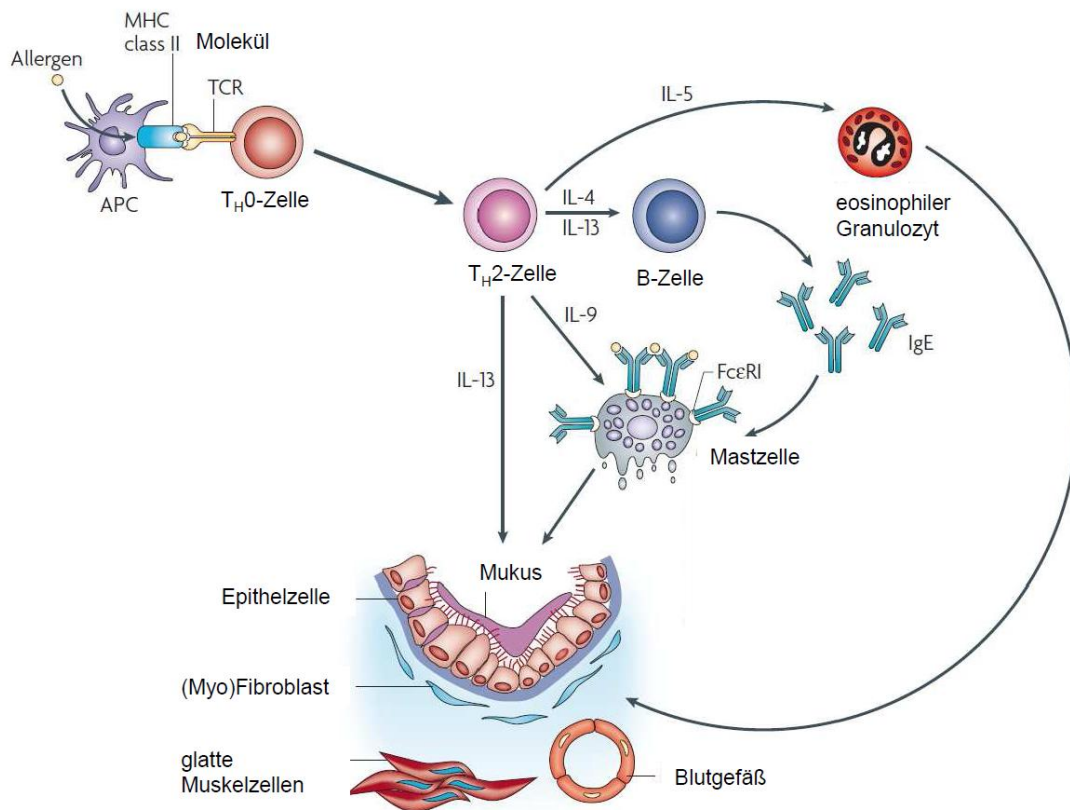


Abb.1 Die allergische Entzündungsreaktion: Sensibilisierung und Effektorphase.

Dendritische Zellen nehmen Allergene auf, prozessieren diese und migrieren als aktivierte Zellen in regionale Lymphknoten. Dort präsentieren sie naiven T-Zellen Peptide des Allergens, was zu einer Aktivierung der T-Zellen und in Präsenz frühen IL-4 zur T_H2-Differenzierung führt. Von T_H2-Zellen sezernierte Zytokine induzieren in B-Zellen den Klassenwechsel zu IgE. Nach systemischer Verteilung des IgE, wird es durch hochaffine IgE-Rezeptoren (FcεRI) auf Mastzellen gebunden. Bei erneutem Allergenkontakt werden Mastzellen durch die Allergenbindung aktiviert und sezernieren eine Reihe vorgeformter inflammatorischer Mediatoren. Diese bewirken eine akute Bronchokonstriktion, Vasodilatation, gesteigerte Mukusproduktion und die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge. Eosinophile Granulozyten und T_H2-Zellen sezernieren Zytokine und Mediatoren, die sowohl die Bronchokonstriktion und Mukusproduktion als auch die Schädigung des Epithels verursachen. (modifiziert nach Holgate und Polosa, 2008).

Die Initiation der Frühphasereaktion geschieht durch die Aktivierung der Mastzellen, die auf ihrer Oberfläche allergen-spezifisches IgE tragen. Nach Bindung des Allergens durch die FcεRI werden Mastzellen aktiviert, degranulieren und schütten pro-inflammatorische und vasodilatatorische Mediatoren, wie Histamin, Prostaglandine,

Leukotriene, *tumor necrosis factor α* (TNF- α) sowie proteolytische und glykolytische Enzyme aus (Galli et al., 2008). Diese Mediatoren bewirken die schnelle Kontraktion der Atemwegsmuskulatur, welche zur akuten Obstruktion der Atemwege führt und das Hauptmerkmal der Sofortreaktion darstellt. Des Weiteren erhöhen sie die Gefäßpermeabilität und die epitheliale Mukusproduktion. Als Folge verdickt sich die Atemwegswand weiter, wodurch sich die Atemwege verengen und zur Atemwegsobstruktion beitragen. Zudem kann eine starke Plasma-Exsudation in die Atemwege beobachtet werden (Van et al., 1995). Ungefähr 6-9 Stunden nach Allergenkontakt wird die Spätphase-Reaktion, durch die Freisetzung vorgeformter Zytokine durch Mastzellen, initiiert. Diese Mediatoren vermitteln die Infiltration der Atemwege durch allergen-spezifische *cluster of differentiation* (CD) 4+ T-Lymphozyten, Makrophagen und eosinophile Granulozyten (Bousquet et al., 2000). Das von T_H2-Zellen sezernierte IL-13 erhöht die Produktion von Muzinen im Epithel und ist an der Hyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur beteiligt (Cohn et al., 2004; Wills-Karp, 2004). IL-5 vermittelt die Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark. Die während der Entzündung freigesetzten *C-C motif ligand* (CCL) 5 (*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*; RANTES) und Eotaxin vermitteln die Rekrutierung dieser in die Lunge (Jeffery, 2001). In der Lunge angekommen, sezernieren die Zellen des Infiltrats eine Vielzahl an Mediatoren, z.B. *major basic protein* (MBP), GM-CSF, Eotaxin, *platelet activating factor* (PAF), Leukotriene, Sauerstoffradikale, *eosinophilic cationic protein* (ECP), *eosinophil peroxidase* (EPX) aber auch die T_H2- Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, sowie unterschiedliche Wachstumsfaktoren (Cohn et al., 2004). Als Folge dieser zunächst akuten Atemwegsentzündung resultiert die Kontraktion und Hyperreagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur, die Beschädigung und Ablösung des bronchialen Epithels, die erhöhte Schleimproduktion und vaskuläre Permeabilität (Fireman, 2003). Die geschilderte Entzündungsreaktion wird bei jedem Allergenkontakt initiiert. Im Zuge der Chronifizierung der Entzündungsreaktion verändert sich zum einen das zelluläre Infiltrat, so sind in der chronischen Phase auch neutrophile Granulozyten in den Atemwegen nachweisbar (Fahy, 2009). Zum anderen sind histopathologische Veränderungen der bronchialen Atemwegswand zu beobachten (Bai, 2010). Die Mechanismen, welche zur Chronifizierung der allergischen Entzündung führen sind bisher nicht geklärt. Postuliert wird eine Art Selbsterhaltungsmechanismus der Entzündungsreaktion, bei dem die wiederholte Aktivierung von T_H2-Zellen als Schlüsselereignis in diesem Prozess betrachtet wird (Galli et al., 2008). Die durch T_H2-Zellen freigesetzten Zytokine vermitteln die wiederholte Reifung und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das Lungengewebe. Diese sind allerdings auch in der

Lage, das für ihre Reifung benötigte IL-5 zu produzieren. Durch die Freisetzung zytotoxischer Metabolite und anschließender Schädigung des Atemwegepithels, können eosinophile Granulozyten zudem die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induzieren, die sowohl die Rekrutierung als auch das Überleben von Leukozyten am Entzündungsherd vermitteln (Fireman, 2003).

1.1.2 Histopathologische Veränderungen in chronisch entzündeten Atemwegen - *Airway Remodeling*

Als Hauptmerkmal der chronisch allergisch entzündeten Lunge kann die starke Infiltration der Atemwege durch unterschiedliche Entzündungszellen beobachtet werden. Neben CD4+-T Zellen kann die Akkumulation von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und AK-sezernierenden B-Zellen histologisch nachgewiesen werden. In den Atemwegen aktiviert, sezernieren diese Zellen unterschiedliche Mediatoren, welche zu Veränderungen im strukturellen Kompartiment der Atemwege führen können. In der Epithelzellschicht können Areale abgelösten Epithels beobachtet werden, die wahrscheinlich auf die Freisetzung zytotoxischer Metabolite, wie *eosinophilic cationic protein* (ECP), EPX und MBP durch eosinophile Granulozyten zurück zu führen ist. Eine Becherzell- Hyperplasie im Epithel chronisch entzündeter Atemwege (Bousquet et al., 2000) wird durch die charakteristischen T_H2-Zytokine IL-9 und IL-13 vermittelt. IL-13 induziert in Epithelzellen die erhöhte Produktion von Mucin- Genen, vor allem *MUC5a* (Curran and Cohn, 2010). Im subepithelialen Kompartiment, in der Lamina (L.) fibroreticularis der Basalmembran (BM) kann eine Fibrosierung beobachtet werden (Brewster et al., 1990;Roche et al., 1989). Die subepitheliale Fibrose wird als Resultat der unvollständigen Heilung des beschädigten Epithels auf wiederholte Episoden der Entzündung betrachtet. Einer neueren Hypothese folgend könnten bereits im Kindesalter Defekte im strukturellen Kompartiment des Organs vorliegen. Entweder genetisch bedingt oder durch eine frühkindliche virale Schädigung der Organstruktur könnte eine frühe Aktivierung der *epithelial mesenchymal trophic unit* (EMTU), damit eine veränderte und verstärkt abgelagerte Matrix, zur Pathogenese der Erkrankung beitragen (Fedorov et al., 2005). Diese Möglichkeit wird für chronisch entzündliche Erkrankungen der Lunge, wie das Asthma bronchiale und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), diskutiert (Barbato et al., 2006;Jeffery, 1994;Jeffery, 2001). Durch pro-fibrotische Faktoren vermittelt, werden vor allem Kollagene des Typs I, III und V, sowie die Matrixproteine Fibronectin und Tenascin durch Fibroblasten und Myofibroblasten produziert (Bai, 2010). Die gesteigerte Produktion der

Matrixkomponenten wird sowohl auf die Zunahme der Fibroblastenpopulation unterhalb des Epithels, durch lokale Proliferation, Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten und der Transdifferenzierung epithelialer Zellen (*epithelial mesenchymal transition*, EMT), als auch der gesteigerten Syntheserate zurückgeführt (Bai, 2010). So kann eine 2-3 fache Verdickung der L. fibroreticularis in asthmatischen Patienten beobachtet werden (Brewster et al., 1990; Roche et al., 1989). Die Verdickung der glatten Muskelzellschicht, aufgrund einer Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen, in asthmatischen Atemwegen ist durch verschiedene morphometrische Studien dokumentiert (Benayoun et al., 2003; Regamey et al., 2008). Zur Verdickung der Atemwege tragen zudem Ödeme bei, so dass die strukturellen Veränderungen insgesamt eine Zunahme in der Masse von bis zu 300 % bei Patienten mit schwerem Asthma führen (Jeffery, 2001).

1.2 Beeinträchtigung der Lungenfunktion verursacht durch *Airway Remodeling*

Das Asthma bronchiale äußert sich symptomatisch vor allem in einer teilweise reversiblen Bronchoobstruktion, welcher eine Hyperreagibilität glatter Muskelzellen zu Grunde liegt. In einigen Patienten jedoch scheint eine persistente Atemwegsobstruktion aufzutreten (Bleecker, 2004), welche auch durch Einsatz von Bronchodilatoren (β -Sympathomimetika) und anti-entzündlicher Medikation (Kortikosteroide) nicht therapierbar scheint und vor allem mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert wird. Diese Befunde legen eine veränderte Funktion der glatten Muskelzellen nahe, die zum einen auf der veränderten Struktur dieser Zellen selbst, zum anderen auf der veränderten Interaktion dieser Zellen mit ihrer veränderten Umgebung beruhen. Auch die Beobachtung, dass Asthma-Patienten über die Zeit eine schneller voranschreitende Verschlechterung der Lungenfunktion, gemessen an einer Abnahme der *forced expiratory volume in 1second* (FEV1), gegenüber gesunden Patienten erleiden (Bai et al., 2000; Grol et al., 1999; Lange et al., 1998), ließen einen Einfluss des *airway remodeling* auf die Lungenfunktion vermuten. Während für unterschiedliche entzündliche Mediatoren eine direkte Beteiligung an der Vermittlung der Bronchokonstriktion gezeigt werden konnte, ist die Rolle der strukturell veränderten Kompartimente kaum geklärt. Als funktionelle Konsequenz der verdickten Atemwegswand, die Summe der Ödeme und des *airway remodeling*, resultiert die Verringerung des Atemweglumens und damit die Erhöhung des Atemwegwiderstands (Bousquet et al., 2000). In diesem Zusammenhang scheinen die strukturellen

Veränderungen im distalen Kompartiment der Atemwege eine besondere Rolle zu spielen, da sich jegliche Verringerung des Atemweglumens in einer deutlichen Zunahme des Atemwegwiderstands niederschlägt. Die Konsequenz der gesteigerten Mukussekretion für die Lungenfunktion ist eine Reduktion der Oberflächenspannung innerhalb der Lunge, die mit einem erhöhten Risiko des Atemwegkollapses einhergeht (Elias et al., 1999). Die Rolle der subepithelialen Fibrose im bronchialen Kompartiment wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird der vermehrten Akkumulation des retikulären BG eine protektive Rolle zugeschrieben, welcher nach sie durch die erhöhte Versteifung des Gewebes der Bronchokonstriktion durch glatte Muskelzellen entgegenwirkt (Pare et al., 1997). Die verstärkte Fibrosierung und damit verbunden die Versteifung des Gewebes wirkt sich aber auch auf die Dehnbarkeit der Atemwege aus (Ward et al., 2001). Die Konsequenz einer verdickten Kollagenschicht im alveolären Bereich scheint unumstritten mit der Versteifung des Gewebes und einer Beeinträchtigung des Gasaustauschs einherzugehen (Elias et al., 1999).

1.3 Pathophysiologie der Fibroseentstehung

Der Fibrosierung liegt im Allgemeinen die Vermehrung des retikulären Bindegewebes (BG) im betroffenen Organ zu Grunde, welche eine Verhärtung und Vernarbung des Gewebes nach sich zieht. Klinisch können organspezifische Fibrosen, wie die der Leber, der Niere, des Herzens und der Lunge, beobachtet werden. Die verschiedenen Fibrosen können hierbei unterschiedlicher Ätiologie sein, ihre Entstehung scheint aber auf einem ähnlichen Mechanismus zu beruhen. Die Gewebsfibrose ist durch die fortlaufende Verdrängung der für die Organfunktion spezifischer Zellen gekennzeichnet und auf den Ort der Schädigung begrenzt. Sie wird ab einem gewissen Stadium als nicht reversibel betrachtet und geht mit dem Funktionsverlust des jeweiligen Organs einher. Auslösende Faktoren sind Viren, Bakterien, Umweltschadstoffe und Allergene. Die Fibrose wird als unvollständiger Reparaturversuch des Gewebes verstanden, bei dem eine chronische und/oder persistierende Entzündung sowohl die Produktion von fibrotischen Wachstumsfaktoren aufrecht erhält als auch den Abbau der Matrix-Moleküle verhindert (Wynn, 2007). Die beteiligten Zellpopulationen und molekularen Mechanismen werden in Folgenden erläutert.

Regenerative Wundheilung

Das BG wird unter physiologischen Bedingungen durch regulierte Phasen des Auf- und Abbaus kontinuierlich umgebaut. Kommt es aber zu einer Schädigung des Gewebes,

verläuft die regenerative Wundheilung in drei Phasen. Man unterscheidet die Phasen der (i) Entzündung, (ii) Proliferation und (iii) Umbau der Wunde mit der Bildung von Narbengewebe. Hierbei ist das kontrollierte Zusammenspiel der unterschiedlichen residenten Strukturzellen, Matrix-Komponenten, einströmenden Entzündungszellen und lokalen Wachstumsfaktoren entscheidend. Die Verletzung residenter Strukturzellen, wie Epithelzellen, leitet die Phase der Entzündung ein. Verletzte Zellen sezernieren Entzündungsmediatoren, wie Chemokine und Eicosanoide (Strecker-McGraw et al., 2007). Die freigesetzten Botenstoffe erhöhen die Gefäßpermeabilität und regulieren den Einstrom von Leukozyten. In einer zeitlichen Abfolge strömen zunächst phagozytotisch aktive neutrophile Granulozyten in das Gewebe ein (Robson et al., 2001). Sie zerstören und entfernen Bakterien, fremde Partikel und beschädigtes Gewebe (Hart, 2002) und werden durch die gerichtete Apoptose eliminiert. In der Spätphase der Entzündung wandern Makrophagen in das Wundareal ein. Diese Zellen differenzieren sich in dem Wundmilieu aus Blut Monozyten. Makrophagen besitzen eine längere Lebensspanne als neutrophile Granulozyten und führen die Phagozytose fort, wobei sie die apoptotischen Körperchen und Überbleibsel der eliminierten neutrophilen Granulozyten beseitigen. Neben ihrer phagozytotischen Aktivität stellen diese Zellen ein Reservoir für Gewebs-Wachstumsfaktoren, wie *transforming growth factor β 1* (TGF β 1), *epidermal growth factor* (EGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) dar, welche residente Strukturzellen aktivieren (Diegelmann and Evans, 2004). Lymphozyten wandern als letzte Immunzellpopulation in das Wundareal ein. Sie sezernieren pro-fibrotische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF β 1, IL-13 und *platelet derived growth factor* (PDGF) (Li et al., 2006; Parsons et al., 2007; Wynn, 2003). Ist die Immunantwort erfolgreich etabliert wird die Wundheilung eingeleitet. Dieser Abschnitt ist durch die erhöhte Proliferation gekennzeichnet. In dieser Phase werden Fibroblasten und Myofibroblasten im umliegenden Wundareal aktiviert, werden von TGF β 1 und PDGF angelockt und migrieren in die Wunde ein. Dort proliferieren diese Zellen zunächst breitflächig und synthetisieren die Matrix-Proteine Kollagene des Typs I und III, Fibronectin, Hyaluronsäure und Proteoglykane im Übermaß. Hierbei spielt vor allem TGF β 1 und die Aktivierung seiner intrazellulären *mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD)-Proteine eine wichtige Rolle. Durch die Bindung des Liganden dimerisieren die TGF-Rezeptorketten II und I (T β RII und T β RI). Der konstitutiv aktive T β RII phosphoryliert den T β RI, welcher das Signal in das Zellinnere leitet. Der T β RI aktiviert direkt die intrazellulären SMAD2- und SMAD3- Proteine, welche im aktivierten Zustand vom Rezeptorkomplex dissoziieren und das zentrale Signalmolekül SMAD4 binden. Als Komplex translozieren diese Proteine in den Kern und aktivieren TGF β - abhängige Gene (ten Dijke and Hill, 2004) zu denen die

unterschiedlichen Matrixproteine, wie die Kollagene gehören. Für weitere pro-fibrotische Faktoren wie IL-13 konnte gezeigt werden, dass ihre Effekte auf der Induktion von TGF β 1 beruhen (Lee et al., 2001a). Aber auch TGF β 1- unabhängige Signalwege, wie die des *connective tissue growth factor* (CTGF), tragen zur Bildung und Ablagerung der Matrix bei (Leask and Abraham, 2003). Während der Anteil von Kollagen I bei ungefähr 80 % und Kollagen III bei 20 % im gesunden Gewebe liegt, verschiebt sich dieses Verhältnis während der Wundheilung, so dass das flexiblere Kollagen III bis zu 40 % der Kollagene darstellt (Robson et al., 2001).

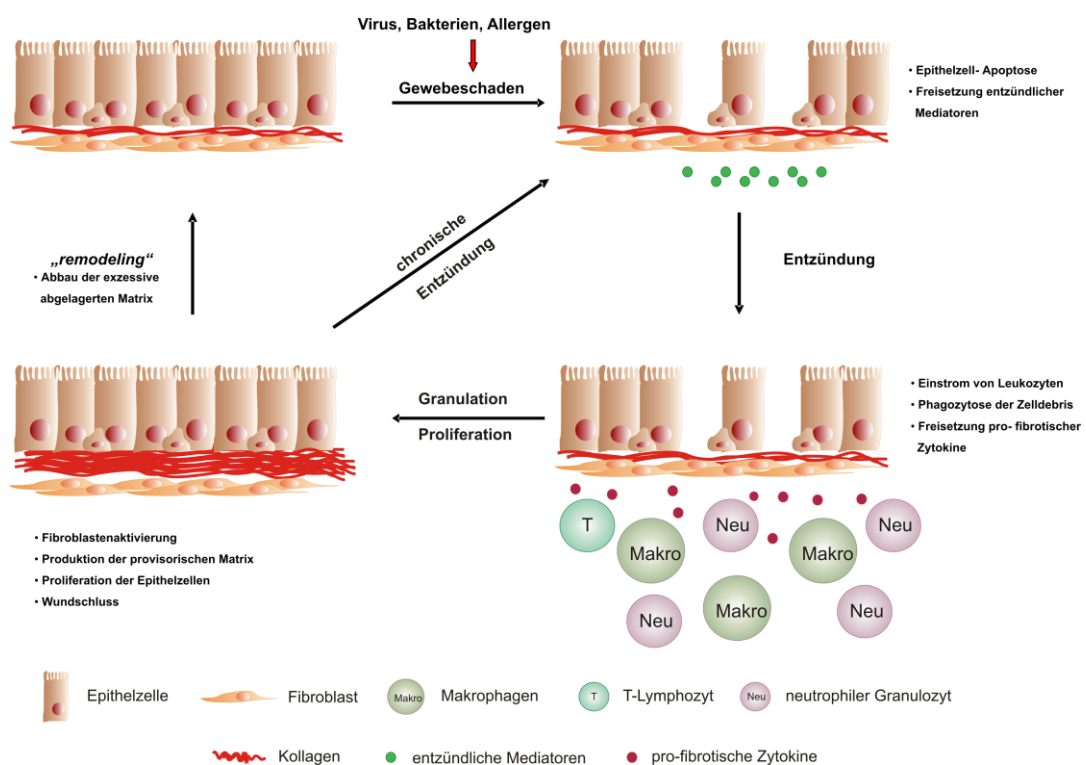


Abb.2 Pathomechanismen der Fibroseentstehung.

Die Beschädigung des Atemwegepithels durch Viren, Bakterien oder Allergene induziert die Freisetzung pro-entzündlicher Mediatoren, welche die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in das verletzte Gewebe vermitteln. Nach Etablierung der Immunantwort, werden Fibroblasten durch pro-fibrotische Faktoren, wie TGF β 1 und PDGF, zur Bildung einer provisorischen Matrix für die epitheliale Proliferation aktiviert. Nach Wiederherstellung des geschlossenen Gewebeverbandes, wird die Matrix sukzessive abgebaut und durch stabilere Matrix ersetzt. Bei einer chronischen Entzündung werden, durch die wiederholte Schädigung des Epithels, gesteigerte Mengen pro-fibrotischer Faktoren freigesetzt. Als Folge wird die Matrixproduktion durch Fibroblasten aufrechterhalten. Die Matrix akkumuliert und führt zur Fibrosierung des Gewebes.

Diese Matrix-Proteine akkumulieren über die Zeit und werden von proliferierenden Epithelzellen als Migrationsvorlage genutzt um die Lücken im jeweiligen Gewebe

aufzufüllen. Zum Abschluss durchlaufen Fibroblasten eine phänotypische und funktionelle Veränderung zum Myofibroblasten und vermitteln über ihren kontraktile Apparat die Kontraktion der Wunde, wodurch die Wundränder zum Zentrum hin gezogen werden und die Wunde sich schließt. Nach erfolgreichem Wundschluss sinken die Konzentrationen an lokal freigesetzten Wachstumsfaktoren, wodurch die weitere Aktivierung residenter und eingeströmter Zellen unterbleibt und diese in Apoptose gehen. Während des Umbaus der Wunde, als letzte Phase der erfolgreichen Wundheilung, wird die provisorische Matrix, welche vornehmlich aus dem flexiblen und instabilen Kollagen III besteht, in Maßen durch das stabilere Kollagen I ersetzt. Ist die Wundheilung erfolgreich abgeschlossen, sind verletzte oder tote Zellen beseitigt und ersetzt, so dass keinerlei Anzeichen auf eine vorangegangene Schädigung mehr hindeuten (Wynn, 2007).

Fibrosierung

Wird der Reparaturzyklus durch wiederholte Schädigung im Gewebe parallel induziert, kann die gerichtete Abfolge der zeitlich voneinander getrennten Phasen außer Kontrolle geraten, so dass Gewebeschädigung, Entzündung und Wundheilung simultan auftreten. Der Reizfaktor hält hierbei die Produktion von Wachstumsfaktoren, proteolytischen Enzymen, angiogenen Faktoren und pro-fibrotischen Zytokinen aufrecht, die wiederum die Produktion und Ablagerung von BG stimulieren (Friedman, 2004; Tomasek et al., 2002). Die Menge an abgelagertem Kollagen wird fortlaufend durch die Synthese und den Abbau reguliert. Diesen Prozess regulieren *matrix metalloproteinases* (MMP) und deren Inhibitoren, die *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) (Pardo and Selman, 2006). Kommt es aber in Zuge einer Dysregulation oder persistentem Entzündungsreiz zu einer Verlagerung in diesem Verhältnis zu Gunsten der TIMPs, wird die Aktivität der MMPs gehemmt, so dass eine weitere Akkumulation der EZM- Komponenten beobachtet werden kann (Tomasek et al., 2002; Wynn, 2007). Des Weiteren nimmt der Pool an Kollagen synthetisierenden Zellen, durch Proliferation, Rekrutierung von Fibrozyten und EMT, zu. Als Resultat übersteigt die Syntheserate der Kollagene die des Abbaus, was zu einem weiteren Anstieg der Kollagenmenge im Gewebe führt.

1.3.1 Fibroblasten

Als Produzenten der Matrix- Proteine konnten neben Epithel- und glatten Muskelzellen vor allem Fibroblasten und Myofibroblasten identifiziert werden. Auf eine Aktivierung folgend, können sie zum Ort der Gewebeschädigung migrieren und große Mengen an Matrix- Proteinen sezernieren. Fibroblasten stellen eine heterogene Zellpopulation dar,

die außer durch Proliferation auch durch einwandernde Fibroblasten- ähnliche Knochenmarks- Stammzellen, den Fibrozyten (Bucala et al., 1994), und Transdifferenzierung aus anderen mesenchymalen Zellen, wie dem Prozess der EMT, entstehen können (Quan et al., 2006; Willis et al., 2006; Zeisberg et al., 2007). Fibroblasten selbst sind ebenfalls in der Lage im Zuge der Wundheilung, auf Zytokinstimulus hin, ihren Phänotyp zu dem des Myofibroblasten zu verändern (Schurch et al., 1998). Bei Myofibroblasten handelt es sich um kontraktile Zellen, die morphologisch und biochemisch eine Zwischenstufe zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen darstellen (Gabbiani, 1992). Sie sind durch die Expression von α -smooth muscle actin (α -SMA), Vimentin, Desmin und Kollagen I charakterisiert. Sie sind in allen Organen zu finden, sind teilungsfähig (Majno, 1979) und in der Lage sich zum Fibroblasten und Myozyten zu differenzieren (Powell et al., 1999). Ihre Fähigkeit große Mengen an Wachstumsfaktoren zu produzieren lässt sie die Aktivität residenter oder rekrutierter Zellen beeinflussen.

1.3.2 Kollagene

Kollagene stellen mengenmäßig den Hauptanteil der faserigen Bestandteile in der extrazellulären Matrix (EZM) dar. Zur Kollagen-Superfamilie gehören 27 genetisch unterschiedliche Proteine, die sich nach der Art, wie sie sich miteinander oder anderen Matrix- Komponenten assoziieren, unterscheiden lassen. Kollagene werden als einzelne pro- α - Ketten synthetisiert, die sich noch intrazellulär zu Triple-Helices zusammenlagern. Eine α -Kette besteht aus einer Reihe der Triplet (Glycin-X-Y)_n Sequenzen, in der X üblicherweise Prolin und Y Hydroxyprolin darstellt. Im Extrazellulärraum lagern sich die einzelnen seilartigen Triple-Helices zu langen dünnen Fibrillen zusammen, die untereinander Querverbindungen eingehen (Myllyharju and Kivirikko, 2004). Diese Verbindungen führen zur Ausbildung eines Netzes, welches durch die Bildung hoch- organisierter langer fester Polymere (Aumailley and Gayraud, 1998), dem Bindegewebe Zugfestigkeit und Elastizität verleiht (Aszodi et al., 1998; Gelse et al., 2003; Trojanowska et al., 1998). Kollagene spielen eine eminente Rolle bei der Strukturhaltung unterschiedlicher Gewebe. Sie sind in ihrer Längsrichtung zugfest, und sind je nach Beanspruchung des Gewebes in Richtung der Belastung ausgerichtet. Ihre Fähigkeit Matrixproteine, wie Fibronectin, zu binden und über Hemidesmosomen und Integrine mit Zellen in Kontakt zu treten lässt die Kollagene neben ihrer Gerüstfunktion aktiv an der interzellulären Kommunikation im Gewebeverband teilnehmen (Sweeney et al., 2008). Sie vermitteln durch solche

Interaktionen die Zell-Adhäsion, Chemotaxis, Migration und das dynamische Wechselspiel zwischen Zellen.

1.4 Neurotrophine

Die Neurotrophine (NT) stellen eine Familie von Wachstumsfaktoren dar, über deren Einfluss auf die Ausbildung und Ausprägung der chronisch allergischen Atemwegsentzündung bisher wenig bekannt ist. Ihre initiale Funktion wurde im neuronalen System beschrieben, wo sie in der Vermittlung von Entwicklungs-, Differenzierungs- und Überlebenssignalen für periphere sympathische sowie embryonale sensorische und cholinerge Neurone (Levi-Montalcini, 1987;Whittemore et al., 1986) beschrieben wurden. Zur Familie der NT gehören der *nerve growth factor* (NGF), der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und die Neurotrophine (NT)-3 und -4. Die NT werden als ca. 27 kDa große Vorläuferproteine synthetisiert und über die intrazelluläre enzymatische Spaltung durch Konvertasen und Furin in die Pro-Neurotrophine (Pro-NT) überführt, aus welchen durch weitere Prozessierung die reifen NT gebildet werden (Lessmann et al., 2003;Mowla et al., 2001). Die finale Spaltung in mature Proteine kann intrazellulär erfolgen, aber auch extrazellulär geschehen. Die reifen Proteine sind ca. 12 kDa groß und bilden stabile nicht- kovalent verbundene Dimere. Durch die Spaltung wird das reife carboxy- terminale Protein freigesetzt. Der amino-terminale Anteil des Pro-NT sorgt für die korrekte Faltung und den intrazellulären Transport des NT.

1.4.1 Neurotrophinrezeptoren

NT, in Form von Pro- NT und aktiver Proteine, vermitteln ihre Effekte über zwei unterschiedliche Rezeptorsysteme. Man unterscheidet zum einen die Tropomyosin-verwandte- Tyrosinkinase-rezeptoren (Trk) A, B und C. Die Trk- Rezeptoren, welche über die reifen Proteine aktiviert werden, weisen eine Ligandenspezifität auf. Hierbei bindet NGF präferentiell an TrkA, BDNF und NT-4 an TrkB und NT-3 vermittelt seine Effekte über TrkC. Der p75^{NTR}-Rezeptor gehört zur Superfamilie der Tumor- Nekrose-Faktor- (TNF) Rezeptoren und weist keine intrinsische Kinase- Aktivität auf. Dieser Rezeptor bindet die unterschiedlichen NT, vornehmlich die Pro-NT, mit der gleichen Affinität (Johnson et al., 1986;Martin-Zanca et al., 1989;Radeke et al., 1987;Sutter et al., 1979).

Die Bindung der NT an ihre Rezeptoren führt zur Dimerisierung der Rezeptoren und damit verbunden zur Aktivierung dieser. Neben dem unterschiedlichen Aufbau der

Rezeptoren, unterscheiden sich die aktivierten Signalkaskaden, außer in ihrer Zusammensetzung, auch in ihrer Auswirkung auf das Schicksal der Zielzelle. Während die Trk- Rezeptoren die Zellaktivierung, Differenzierung und Zellüberleben induzieren, kann die Aktivierung des p75^{NTR}-Rezeptors die Apoptose vermitteln (Chao, 2003).

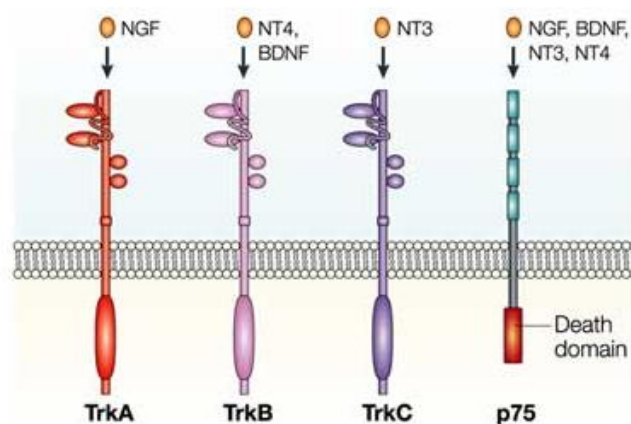


Abb.3 Übersicht der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren.

Die Neurotrophine NGF, BDNF, NT-3 und NT-4 vermitteln ihre biologische Funktion über zwei unterschiedliche Rezeptorsysteme. Die *tropomyosin-related kinases* (Trk) weisen eine Ligandenspezifität auf. NGF bindet präferentiell an TrkA, BDNF und NT-4 an TrkB und NT-3 bindet TrkC. Der p75^{NTR}-Rezeptor besitzt keine intrinsische Kinase-Aktivität und bindet die unterschiedlichen Neurotrophine mit der gleichen Affinität. (entnommen aus Chao MV, 2003)

Die Dimerisierung der Trk- Rezeptoren führt zur anschließenden Autophosphorylierung der Rezeptoren, welcher die Aktivierung von drei intrazellulären Hauptsignalwegen folgt. Über die Rekrutierung des Adapterproteins *Src homology 2 domain containing protein* (Shc) erfolgt über den *rat sarcoma* (Ras)- *rat fibrosarcoma* (Raf)- *extracellular-regulated kinase* (ERK 1/2) Signalweg die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und *cAMP response element binding protein* (CREB) und vermittelt Zelldifferenzierung und Überleben. Über das Adapterprotein Shc wird außerdem die *phosphatidyl- inositol 3-Kinase* (PI3K) aktiviert. Die PI3K ihrerseits induziert die Bildung von Phosphatidyl-inositol 3,4-bisphosphat, welches die *3-phosphoinosit-dependent-Kinase-1* (PDK-1) zu Zellmembran rekrutiert und zur Aktivierung der Akt (Proteinkinase B) führt. Akt induziert über die Aktivierung der PKC ξ direkt, oder über das kleine G-Protein Rac und anschließende MAPK- Kaskade die Gen-Transkription. Der dritte Signalweg beinhaltet die Rekrutierung der Phospholipase C γ (PLC γ), welche nach Aktivierung Phosphatidyl-inositol 4,5- bisphosphat in Inositol Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) spaltet. IP3 induziert die Freisetzung intrazellulär gespeicherten Calciums. Das

freigesetzte Calcium hilft DAG bei der Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC). Die PKC aktiviert über Rac oder MAPK-Kinasen (MKK) die p38 Kinase und ERK1/2.

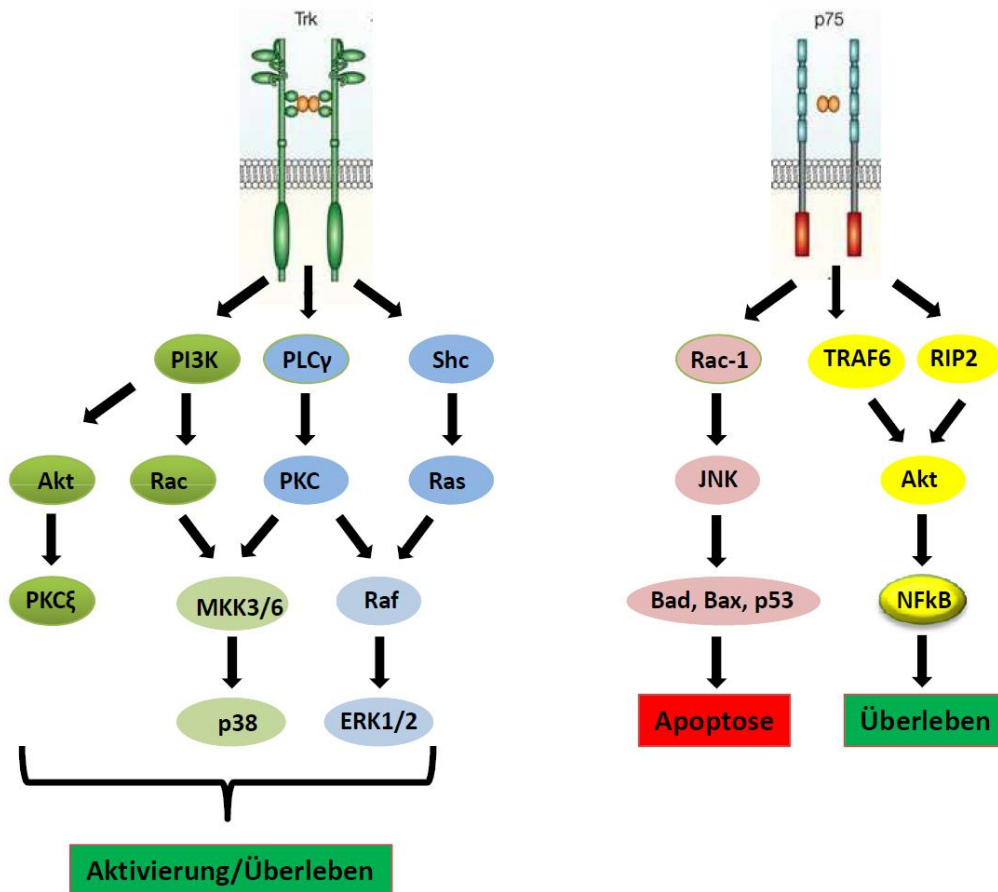


Abb.4 Intrazelluläre Signalkaskaden der aktivierten Neurotrophinrezeptoren.

Bei Aktivierung der Trk-Rezeptoren wird das Signal über drei Hauptwege in den Kern geleitet. Die PLCγ/PKC und Ras aktivieren die MAPK p38 und ERK1/2. Die PI3K aktiviert die Akt, die entweder über das kleine G-Protein Rac in den MAPK-Signalweg mündet, oder MAPK-unabhängig die PKCξ aktiviert. Diese Signalkaskaden vermitteln die Aktivierung und das Überleben der Zielzelle. Die Aktivierung des p75^{NTR} durch NGF kann entweder über Rac-1 und JNK die Apoptose einleiten. Oder, durch Rekrutierung von TRAF6 und RIP2, NFκB aktivieren und das Überleben der Zielzelle vermitteln. (modifiziert nach Chao MV, 2003)

Der p75^{NTR}-Rezeptor, ein 75-kDa großes Glykoprotein, ist über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Die Aktivierung des p75^{NTR}-Rezeptors kann zwei unterschiedliche Effekte in der Zielzelle induzieren. Zum einen wird über die Aktivierung von *TNF-receptor associated factor 6* (TRAF6) und *IL1 receptor-associated kinase* (IRAK), Rekrutierung des *receptor-interacting protein-2* (RIP2) und der Aktivierung der PI3K und Akt der *nuclear factor kappa B* (NFκB) aktiviert und führt zur Transkription anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie. Zum

anderen kann der aktivierte Rezeptor auch Apoptose induzieren. Hierbei nimmt die *c-Jun N-terminale kinase* (JNK) eine zentrale Stellung ein. Sie wird über die GTPase Rac1 aktiviert und phosphoryliert pro- apoptotische Proteine, wie Bad, Bax und p53. Dies verursacht die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien und führt zur Aktivierung der Caspasen -3 und -9 (Bruckner et al., 2001; Casaccia-Bonofil et al., 1996; Lee et al., 2001b).

Es existieren unterschiedliche Isoformen des p75- Rezeptors, die durch alternatives *splicing* im dritten Exon zustande kommen. Hierdurch wird eine verkürzte Form produziert, der in der Extrazellulärdomäne die NT- Bindungsdomäne fehlt (Roux and Barker, 2002). Diese Isoform ist nicht mehr in der Lage NGF zu binden, wird aber an die Zellmembran transportiert und exprimiert. Darüber hinaus kann die Extrazellulärdomäne des p75- Rezeptor nahe der Zellemembran durch α - Sekretasen (*a disintegrin and metalloprotease domain* (ADAM)-10 und -17)) gespalten werden (Chao, 2003). Hierdurch wird ein lösliches Fragment extrazellulär freigesetzt, welches weiter in der Lage ist Neurotrophine zu binden und als *scavenger*- Rezeptor agieren kann (Zupan et al., 1989). Auch die intrazelluläre Spaltung des Rezeptors ist möglich. Hierbei wird durch die γ - Sekretase der Rezeptor nahe der Zellmembran gespalten und ein lösliches Fragment ins Zytoplasma freigesetzt. Dieses Fragment kann zum einen den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren oder selbst in den Kern translozieren und dort die Funktion eines Transkriptionsfaktors wahrnehmen (Kanning et al., 2003).

Die NGF- Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} vermitteln über die Aktivierung ihrer intrazellulären Signalkaskaden unterschiedliche Effekte in der jeweiligen Zielzelle. Das Expressionsmuster der Rezeptoren entscheidet somit über das Schicksal der NGF-abhängigen Zellen. Für einige Zellen ist nur die Expression von TrkA beschrieben, was mit der Aktivierung und Differenzierung der Zelle einhergeht. Für andere Zellen ist nur die Expression von p75^{NTR} beschrieben. In diesen Zellen kann die NGF vermittelte Aktivierung zur Apoptose führen. Bei einigen Zellen jedoch kann auch die Ko-Expression beider Rezeptortypen beobachtet werden. In diesem Fall können die Signale über beide Rezeptoren einander entgegenwirken, oder aber über die Bildung von *high affinity binding sites* kann es zu einer Verstärkung des NGF- Effekts kommen (Chao, 2003).

1.4.2 Neurotrophine in der allergischen Atemwegsentzündung

Die erhöhte Expression von NT, vor allem NGF, kann in unterschiedlichen chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie der Haut und der Lunge beobachtet werden (Dagnell et al., 2010; Raap et al., 2005; Raychaudhuri and Raychaudhuri, 2009; Scuri et al., 2010). Die Bedeutung der Neurotrophine als Effektormoleküle in der allergischen

Atemwegsentzündung beruht auf dem Befund, dass NGF und BDNF in Seren (Bonini et al., 1996) und der bronchoalveolären Lavage (BAL) an Allergien leidender Patienten erhöht vorlagen (Virchow et al., 1998). Diese erhöhten NT- Spiegel in der BAL konnten nach lokaler Allergenprovokation in Patienten (Virchow et al., 1998) und im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung (Braun et al., 1998) gesteigert werden. Für die Ausbildung einer allergischen Entzündungsreaktion sind die Entwicklung, die Reifung und die Proliferation unterschiedlicher Immunzellpopulationen unerlässlich. Bereits in diesen Phasen konnte den NTs eine eminente Rolle zugeschrieben werden (Brodie and Gelfand, 1992; Ehrhard et al., 1993; Garcia-Suarez et al., 2002; la Sala et al., 2000; Lambiase et al., 1997; Maroder et al., 1996).

Die erhöhten pulmonalen NT-Spiegel ließen eine Beeinflussung der lokalen allergischen Immunantwort durch NT, insbesondere NGF, vermuten. Als zelluläre Quellen für NGF in der allergisch entzündeten Lunge konnten das aktivierte Epithel (Hahn et al., 2006) und einströmende Entzündungszellen (Olgart et al., 2002) identifiziert und mit der Beeinflussung sowohl der Frühphase als auch Spätphase der allergischen Reaktion in Verbindung gebracht werden. In der Frühphase vermittelt NGF die Atemwegsobstruktion (Path et al., 2002) und vermittelt die Hyperreagibilität der Atemwege über die Induktion von Tachykininen, wie Substanz P, durch sensorische Neurone in den Atemwegen (de Vries et al., 1999). Die Rolle von NGF in der Spätphase, welche von einer starken Infiltration der Atemwege durch Entzündungszellen geprägt ist, beruht zum einen in der Beeinflussung der T_H2-Zytokin- (IL-4) und der AK- Produktion der Subklassen IgE und IgG₁ durch Lymphozyten (Braun et al., 1998). Zum anderen fördert NGF als „trophischer“-Faktor das Überleben unterschiedlicher Immunzellpopulationen im Gewebe, wie eosinophile Granulozyten (Hahn et al., 2006; Nassenstein et al., 2003a) und B- Gedächtniszellen (Torcia et al., 1996) und trägt somit zur Perpetuation der allergischen Entzündungsreaktion in den Atemwegen bei.

1.4.3 NGF in der Wundheilung

Die wiederholt induzierte oder chronisch etablierte Entzündung führt zu strukturellen Veränderungen in der Atemwegswand. Die Rolle von NGF bei Wundheilungsprozessen in allergisch entzündeten Atemwegen ist kaum untersucht. Auch über die potentielle Beteiligung von NGF in der chronisch entzündeten Lunge, welche durch das *airway remodeling* gekennzeichnet ist, sind kaum Erkenntnisse vorhanden. Die potentielle Beteiligung von NGF in der Vermittlung von Wundheilungsprozessen basiert auf dem Nachweis erhöhter NGF- Spiegel in unterschiedlichen geschädigten Geweben (Kawamoto and Matsuda, 2004; Nithya et al.,

2003) und dem Nachweis der Expression der NGF- Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf Strukturzellen, wie z.B. Epithelzellen (Di Marco et al., 1993), Fibroblasten (Micera et al., 2001a) und glatten Muskelzellen (Freund-Michel et al., 2006). Gegenwärtig wird NGF eine bedeutende Rolle bei der bi-direktionalen Kommunikation der unterschiedlichen Zellpopulationen im Wundheilungsprozess zugeschrieben. Diese Überlegung basiert auf dem Nachweis der differentiellen Expression von NGF und den Rezeptoren, TrkA und p75^{NTR}, auf eine Gewebeschädigung hin und des sich anschließenden Heilungsprozesses (Ebadi et al., 1997;Nithya et al., 2003). Während in Epithelzellen beide NGF- Rezeptoren nur in der Proliferationsphase exprimiert werden (Di Marco et al., 1993), wird in Fibroblasten TrkA konstitutiv und p75^{NTR} auf NGF-Stimulus hin nachweisbar (Micera et al., 2006). Die, durch unterschiedliche klinische Studien beobachtete, wundheilungsfördernde Aktivität von NGF (Bernabei et al., 1999;Bonini et al., 2000;Lambiase et al., 1998) wurde in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*- Modellen auf zellulärer Ebene untersucht (Lambiase et al., 2000;Micera et al., 2001b;Sonar et al., 2010). Die koordinierte und enge Interaktion von Strukturzellen, insbesondere Epithelzellen und Fibroblasten, nimmt eine zentrale Rolle im Prozess der Wundheilung ein. Als Effektorfunktion in Strukturzellen war die gesteigerte Proliferation von Epithelzellen zu beobachten (Sonar et al., 2010). Untersuchungen an Fibroblasten zeigten eine NGF- vermittelte gesteigerte Migration, Produktion von BG und Kontraktilität (Nithya et al., 2003). Da beide Zellpopulationen auch in der Lage sind NGF zu produzieren, können diese Ereignisse autokrin, aber auch parakrin vermittelt sein.

Ob diese Mechanismen in der allergisch entzündeten Lunge zutreffen und in der chronischen Phase der Erkrankung zu der Fibrosierung beitragen ist bisher völlig ungeklärt. Die erhöhten NGF- Spiegel in Patienten, aber auch die Erkenntnisse aus *in vitro* und *in vivo* Modellen der allergischen Atemwegsentzündung lassen vermuten, dass der epitheliale Faktor NGF eine entscheidende Rolle bei fehlgeleiteten Reparaturmechanismen spielt.

1.5 Zielsetzung

Die übermäßige Produktion und Ablagerung von Kollagenmolekülen durch Fibroblasten stellt ein Charakteristikum vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen dar und wird mit dem Funktionsverlust des betroffenen Organs assoziiert. Die übermäßige Matrix- Ablagerung manifestiert sich im chronischen Asthma als subepitheliale Fibrose, wird mit dem Schweregrad der Erkrankung in Verbindung

gebracht und trägt zur Verschlechterung der Lungenfunktion über die Progression der Erkrankung bei. Sie wird als überschießender Reparaturversuch des Gewebes auf einen repetitiven oder chronischen Entzündungsreiz verstanden. Die Produktion und Ablagerung von Kollagen III wird direkt nach der Gewebsverletzung induziert und stellt einen Teil der provisorischen Matrix für die epitheliale Migration und Proliferation dar. Wachstumsfaktoren, welche bei der Gewebschädigung und anschließender Entzündungsreaktion durch verletzte Epithelzellen und einströmende Entzündungszellen freigesetzt werden, steuern den sich anschließenden Heilungsprozess. In diesem Zusammenhang sollte die Rolle des epithelialen Faktors NGF bei fehlgeleiteten Reparaturmechanismen untersucht werden. Ein positiver Einfluss von NGF auf Reparaturmechanismen konnte bereits für unterschiedliche Epithelien sowohl im humanen wie auch im murinen System gezeigt werden. In allergischen Patienten bereits erhöht gebildet, werden die NGF- Spiegel durch lokale Allergenprovokation weiter gesteigert. Vor allem von Epithelien, aber auch Entzündungszellen gebildet, reguliert NGF das Überleben von Immunzellen während der allergischen Atemwegsentzündung. In wie weit diese lokal erhöhten NGF- Spiegel jedoch pathologische Reparaturprozesse, wie die subepitheliale Fibrose, beeinflussen können ist bisher nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollten unter Verwendung eines experimentellen chronischen Asthmamodells der Maus, wie auch molekularbiologischen Experimenten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- (1) Sind die pulmonalen NGF- Spiegel in der experimentell chronisch allergisch entzündeten Lunge erhöht und tragen zur Entstehung der subepithelialen Fibrose bei?
- (2) Induziert NGF die Expression von Kollagen-III in Lungenfibroblasten?
- (3) Sind die beobachteten NGF- Effekte direkt vermittelt, oder besteht eine Abhängigkeit von TGF β 1?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse	Harlan Winkelmann
Ngfr ^{tm1Jae} - Mäuse	Jackson Laboratories
CCSP-NGF-Tg	Zucht

2.2 Zellen

2.2.1 Eukaryotische Zellen

HEK293 (humane embryonale Nierenepithelzellen)	ATCC
--	------

2.2.2 Prokaryotische Zellen

TOP10 One shot E.coli (chemisch competent)	Invitrogen
--	------------

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Acros Organics
Agarose	Merck
BM Blue POD Substrate	Roche
BSA Albumin Fraktion V	Serva
Citratpuffer	Sigma
CollagenaseD	Roche
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablette	Roche
3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Vector
DiffQuick	Dade-Behring
Dulbecco`s Modified essential Medium	PAA Laboratories
Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories
Eosin G	Merck
Esmeron (10mg/ml)	Organon
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich
Ethidumbromid 1% (10mg/ml)	Roth
FuGene HD Transfektionsreagenz	Roche
Fast Green FCF	Sigma- Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS Gold)	PAA Laboratories
HämatoxylinII nach Gill	Merck
HEPES	Sigma
HiPerfect Transfektionsreagenz	Quagen

2. MATERIAL UND METHODEN

Inject [®] Alum (Al(OH) ₃)	Pierce
Ketamin (10mg/ml)	Inresa
L-Glutamin	PAA Laboratories
Methanol	Sigma-Aldrich
Milchpulver	Roth
Natrium-Chlorid (NaCl)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merk
Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories
Nicht-essentielle Amonisäuren	PAA Laboratories
Normalserum (goat)	Dianova
Nuclear Fast Red	DakoCytomation
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Periodsäure	Roth
Pikrinsäure	Fluka
Phosphat-Puffer (PBS)	Biochrom
Phospho-Stop Tablette	Roche
ProteinA- Agarose	Roche
ReagentDiluent	R&D
RNA- Probenpuffer	Sigma
Rompun (2 %)	Bayer
RotiAgarose	Roth
Roti-Clear (Xylo)	Roth
RotiMount	Roth
R.T.U Horseradish Peroxidase Streptavidin	Vector Laboratories
Salzsäure (HCl)	Merck
Schiffs Reagenz	Roth
Schwefelsäure (2M; H ₂ SO ₄)	Merck
SiriusRed	Polysciences
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Roth
Streptavidin- Peroxidase- Komplex	Sigma
Tris-HCL	Roth
Tween 20	Roth
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck

2.4 Kits

BCA	Pierce
CellTiter 96 [®] AQueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay	Promega

2. MATERIAL UND METHODEN

Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
E.Z.N.A DNA-Isolation Kit	Peqlab
Gel-Extraction kit	Qiagen
NGF ImmunoAssay	Promega
Omniscript	Invitrogen
PCR Purification Kit	Roche
Plasmid Mini-Präparations- Kit	Qiagen
Plasmid Maxi-Präparations- Kit	Qiagen
TOPO-TA Kloning Kit	Invitrogen
Rneasy Mini- Kit	Qiagen
TGFβ1 DouSet	R&D Systems

2.5 Nukleinsäuren

Oligonukleotide für den Einsatz in der PCR wurden von der Firma Metabion, small interfering RNA (siRNA) von Qiagen bezogen.

2.5.1 Primer zur Genotypisierung der Versuchstiere

Gen	Primersequenz	Tm	Produkt
NGF-Tg	for: 5'-CATACCCACACATACCCACA-3'	54 °C	WT: -
	rev: 5'-ACATTACGCTATGCACCTGG-3'		Tg: 311bp
p75 ^{NTR} -/-	oIMR 0013 : 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'	58 °C	WT:345 bp
	oIMR 0014 : 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3'	62 °C	
	oIMR 0710 : 5'-TGTTACGTTCTCTGACGTGGTGAG-3'		k.o.: 280bp
	oIMR 0711 : 5'-TCAGCCCAGGGTGTGCACTC-3'		

2.5.2 Primersequenzen zur Generierung der Promotorfragmente

Name	Primersequenz	Tm	Schnittstelle
-1000 bp	for: 5'-AATGCACATGGCCATGATTAGGAT-3' rev: 5'-ACCGGGCCCGTCATAAACTCAG-3'	62 °C	
-500 bp	for: 5'-AAGGTACCTGAGTTCAGGGCCTTCAGAG -3' rev: 5'-AACTCGAGACCGGGCCCGTCATAAACTCCAG-3'	59 °C	KpnI XhoI
-120 bp	for: 5'-AAGGTACCTGCTCCAGATGTGCTGTTTC -3' rev: 5'-AACTCGAGACCGGGCCCGTCATAAACTCCAG-3'	58 °C	KpnI XhoI

2.5.3 Primer für mRNA Expressionsuntersuchungen (murin)

Gen	Primersequenz	Tm	Produkt
Collagen3	for : 5'-GCAGGACCCAGAGGAGTAG -3' rev : 5'-TTCCATCATTGCCTGGTC-3'	54 °C	105 bp
L32	for : 5'-AAGCGAAACTGGCGGAAACC-3' rev: 5'-CTGGCGTTGGGATTGGTGAC-3'	62 °C	290 bp
Vimentin	for: 5'- TCCCTTGTTGCAGTTTTTCC-3' rev: 5'-TGGACGTGGTCACATAGCTC-3'	59°C	154bp

2.5.4 small interfering RNA

Zielgen	Sequenz	Eingesetzte Konzentration
SMAD4	r(GCACAAGGUUAGUUUUUA)dTdT r(UAAAUAAACUAACCUUGUGC)dCdT	5nmol
TrkA	r(AGUGGAGAAGAAAGAUGAA)dTdT r(UUCAUCUUUCUUCUCCAC)dGdG	5nmol

2.5.5 Vektoren

pcDNA3_ratTrkA (WT und K538R)	Moses V. Chao, Skirball University
pGL4.10	Promega
pGL4.73	Promega
TOPO-PCR2.1	Invitrogen

2.5.6 Nukleinsäure Standards

DNA-Leiter (50- 1000 bp)	Peqlab
GeneRuler (200 bp- 10000 bp)	Fermentas

2.6 Proteine

2.6.1 rekombinante Proteine

anti-human NGF	PeproTech EC.
humanTGF-β1	PeproTech EC.
humanβ-NGF	PeproTech EC.
Ovalbumin GradeV	Sigma
Ovalbumin GradeVI	Sigma

2.6.2 Primärantikörper

Antikörper (Spezies)	Klon	Verdünnung	Firma
Anti-β actin (Maus, monoklonal IgG1)	AC-15	1:40.000	Sigma
Anti-CD31 (Ratte, monoklonal IgG2ak)	MEC13.3	1:100	BD Bioscience
Anti-CD45 (Rat, monoklonal IgG2bk)	30F11.1	1:100	Miltenyi
Anti-p38 MAPK (Kaninchen, polyklonal IgG)	#9211	1:1000	CellSignaling
Anti-p44/42 MAPK (Kaninchen, polyklonal IgG)	#9102	1:1000	CellSignaling
Anti-phospho- p38 MAPK (Kaninchen, polyklonal IgG)	#9212	1:1000	CellSignaling
Anti-phospho-p44/42 (Kaninchen, polyklonal IgG)	#9101	1:1000	CellSignaling
Anti-phospho-Tyrosin (Maus, monoklonal IgG1)	2C8	1:500	SantaCruz
Anti-SMAD4 (Kaninchen, polyklonal IgG)	H-552	1:500	SantaCruz
Anti-smooth muscle asctin (Kaninchen, polyklonal IgG)	ab5694	1:250	Abcam
Anti-TrkA (Kaninchen, polyklonal IgG)	763	1:1000	SantaCruz

2.6.3 Sekundärantikörper

Anti-Maus IgE (biotinyliert)	BD Pharmingen
Anti-Maus IgG1 (biotinyliert)	BD Pharmingen
Anti-mouse IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-OVA IgE	BD Pharmingen
Anti-OVA IgG1	BD Pharmingen
Anti- Kaninchen (biotinyliert)	Vector Laboratories
Anti- Kaninchen IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma-Aldrich
Anti-Ziege- IgG (Peroxidase-gekoppelt)	Sigma-Aldrich

2.6.4 Enzyme

EcoRI	Fermentas
EcoRI Reaktionspuffer	Fermentas
DnaseI	Invitrogen
KpnI	Fermentas
QuantiTect TM SYBR [®] Green PCR Master Mix	Qiagen
RedTaq Ready-Mix Kit	Sigma
RNaseOUT	Invitrogen
Superscript II TM Reverse Transkription	Invitrogen
T4 Ligase	Invitrogen
XhoI	Fermentas

2.6.5 Proteinstandards

MagicMarx XP

Invitrogen

2.7 Lösungen, Nährmedien und Puffer

2.7.1 Lösungen

Ovalbumin-Lösungen:

Lösung zur Immunisierung (pro Tier): 10mg OVA GradeVI/1.5mg Al(OH)₃
in 200µl PBS

Aerosol –Lösung: 1 % OVA Grade IV in PBS

Narkoselösung (5x): 10ml Ketamin (50mg/ml)/3.125ml Rompun

Ampicillin-Stammlösung: 100mg/ml Ampicillin in dH₂O

2.7.2 Nährmedien für Säugerzellen

Primäre Lungenfibroblasten: DMEM (low glucose)/ 10 %FCS/ 1 %
PenicillinStreptomycin (PenStrep)/1 %nicht
essentielle Aminosäuren/ 1 % Na-Pyruvat/ 1 %
L-Glutamin

HEK293 DMEM/ 10 % FCS/ 1 %PenStrep

2.7.3 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium: 1 %NaCl/ 0,5 %Hefeextrakt/ 1%Pepton in dH₂O

LB-Agar 1.5 % Bakto-Agar in LB-Medium

2.7.4 Puffer

Puffer für ELISA

Phosphapuffer 0.1M NaHCO₃; pH 8.3

2. MATERIAL UND METHODEN

TBST-Waschpuffer 1x): 20mM Tris-HCl (pH 7.6)/ 150mM NaCl/ 0.05 % Tween[®] 20 (v/v)

PBST-Waschpuffer 1M PBS/ 0.05 % Tween[®] 20 (v/v)

Probenvorbereitungspuffer

Aktivierungspuffer TGFβ1 1M HCl

Neutralisierungspuffer TGFβ1 1,2M NaOH/ 0.5M HEPES

Blockierungspuffer

TGFβ-ELISA 1M PBS/ 5 % Tween[®] 20 (v/v)

Immunglobulin-ELISA 1M PBS/ 1 %BSA

Puffer für Protein-Isolation und Western blot

Lyse-Puffer 50mM TrisHCl (pH7.5)/ 150mM NaCl/ 1 %Nonidet 40/ Protease-Inhibitor/ Phosphatase-Inhibitor

Lämmli-Puffer (10x) 100mM TrisHCl (pH7.5)/ 1 % SDS/ 1 % Saccharose/ 1 % Glycerin

Probenpuffer (2x) 150mM Tris (pH 6.8)/ 1.2 %SDS/ 3.3 %Glycerin/ 1.8 % Bromphenolblau

Puffer für Sammelgel 1M TrisHC (pH 6.8)/ 0.4 % SDS

Puffer für Trenngel 1,5M TrisHCl (pH 8.8)/ 0.4 % SDS

Proteingel-Laufpuffer 30g Tris-Base/ 10g SDS/ 250g Glycin ad 1l dH₂O

Transferpuffer 300 mg Tris/ 144mg Glycin/ 100ml Ethanol ad 1l dH₂O

Puffer für DNA-Agarose Gele

DNA-Probepuffer (6x) 10 % Glycerol/ 40 % Saccharose/ 0.25 % Bromphenolblau

TBE (10x) 108g Tris-Base/ 55g Borsäure/ 40ml 0.5M EDTA (pH 8.0) ad 1l dH₂O

2.8 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, 24x36mm	Menzel
Falconröhrchen 15ml, 50ml	GreinerBio
Gewebeschalen 6cm	Greiner Bio-One
Insulinspritze (1ml)	Braun
Kanüle	BD
Kanüle 20G	Harvardapparat
Kryotubes 1,7ml	Sarstaedt
Magnetrührer	Kobe
MaxiSorp™ Surface, 96 well Platten	Nunc
Multiwellplatten 6-, 12-, 24-, 48- well	Greiner Bio-One
Objektträger	Menzel
Rasierklinge	Wilkinson
Reaktionsgefäße (0,1ml)	LTF
Reaktionsgefäß (0.5ml)	KH Zehlendorf
Reaktionsgefäß (1.5ml)	Eppendorf
Skalpell	Feather
Super-Frost Objektträger	Menzel
Zellkulturflschen T25, T75	Nunc
Zellsieb 100µm Porengröße	BD

2.9 Geräte

Acrylkammer (20 x 20 x 15 cm)	KH Zehlendorf
Accu-Cut® SRM™ 200 Rotary microtome	Sakura
Casy®-Cell-Counter	SchärfeSystems
FlexiVent® small animal ventilator	Scireq
Megafuge 1.0R	Hereaus
Mikrowelle	Privileg
Pari® Master	Pari
Potter	Kobe
Lichtmikroskop (BX51)	Olympus
Absorptionsphotometer Magellan	Tecan
RotorGene3000®	LTF
Geldokumentation	Bio-RAD
TRIO-Thermoblock	Biometra

Inkubator	Heraeus
GentlMACS®	Miltenyi

2.10 Software

GraphPadPrism4	GraphPrism
RotorGene6 Software	LTF
FlexiVent Software	Scireq
Cell ^F -Imaging Software	Olympus
Photometer Software Magellan2	Tecan

2.11 Versuchstiere und Behandlungsprotokolle

Für das Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung werden weibliche Mäuse im Alter von 6 - 8 Wochen eingesetzt. Die Mäuse wurden in einem belüfteten Käfigsystem gehalten, wobei die Raumtemperatur (RT) 20 °C beträgt und ein künstlicher 12 h- Hell- Dunkelzyklus erzeugt wird. Wasser und Ovalbumin (OVA)- freie Nahrung standen *ad libitum* zur Verfügung.

Die beschriebenen *in vivo* Versuche wurden im Rahmen der Tierversuchsgenehmigung V 54– 19c 20-15 MR 20/13 „Rolle des Nerven-Wachstumsfaktors (NGF) in der Pathogenese der chronisch allergischen Atemwegsentzündung“ durchgeführt.

2.11.1 Mausstämme

NGF-Tg Mäuse exprimieren konstitutiv humanes NGF unter der Kontrolle des lungenspezifischen Promotors für das Clara- Zell sekretorische Protein (CCSP-NGF-Tg) (Hoyle et al., 1998). Diese Mäuse wurden auf den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt und entstammen der eigenen Zucht.

Ngfr^{tm1Jae} – Mäuse auf C57BL/6- Hintergrund (Jackson Laboratories) tragen eine Deletion des dritten Exons im p75^{NTR}- Gen (p75^{NTR}^{exonIII-/-}). Durch die eingeführte Deletion wird kein Protein translatiert. Aufgrund von alternativem *splicing* im dritten Exon, welche die Neurotrophin- Bindestelle betrifft, entsteht ein leicht verkürztes Transkript, welches zwar translatiert und an die Membran transportiert wird, aber keine Signale übertragen kann .

NGF-Tg/p75^{exonIII-/-} Mäuse wurden zur Untersuchung p75^{NTR} abhängiger Prozesse beim Atemwegsumbau aus der Kreuzung der vorhandenen Stämme generiert. Die

Nachkommen wurden auf die Expression des CCSP-NGF Konstrukts sowie der Deletion des Exon III im p75- Gen typisiert (siehe Methode Genotypisierung).

C57BL/6 Mäuse wurden als Wildtyp (WT)- Stamm und als Kontrolltiere für die CCSP-NGF Mäuse, sowie $\text{Ngfr}^{\text{tm1Jae}}$, eingesetzt.

2.11.2 Modell zur Induktion einer chronisch allergischen Atemwegsentzündung

Die Induktion einer chronisch allergischen Entzündungsreaktion setzt die Sensibilisierung eines Organismus gegen ein Allergen voraus. Zur Induktion einer solchen Entzündungsreaktion wird das Modell- Allergen OVA eingesetzt. Hierzu wurden Mäuse durch drei intra peritoneale (i.p.) Injektionen von 10 µg OVA (Grade VI) gekoppelt an 1.5 mg des Adjuvans Aluminiumhydroxid ($\text{Al}(\text{OH})_3$) an den Versuchstagen 1, 14 und 21 systemisch immunisiert. Ab dem Versuchstag 26 wurden die Versuchstiere pro Woche an zwei aufeinander folgenden Tagen für zu 4 Wochen mit einem 1 %igen OVA- Aerosol (Grade V) provoziert. Durch die Inhalation des Allergens wurde die Infiltration des Lungengewebes durch eosinophile Granulozyten wie auch Lymphozyten induziert. Die *akute* allergische Atemwegsentzündung war nach zwei Aerosol- Provokationen in der Lunge etabliert. Die regelmäßige Provokation führte zur Chronifizierung der Atemwegsentzündung, welche in strukturellen Veränderungen in den Atemwegen mündete. Die Gruppe wurde als *chronisch* definiert.

2.11.3 Neutralisierung von NGF im Maus-Modell

Um den Einfluss von NGF auf den Atemwegsumbau zu untersuchen, wurde Mäusen, nach systemischer Immunisierung (siehe 2.11.2), 24 h vor jeder Provokationsepisode ein neutralisierender anti- NGF AK appliziert. Hierzu wurden 10 µg anti- human- NGF (Kaninchen) in 200 µl PBS i.p. injiziert (OVA/anti-NGF). Die Effekte der Injektion wurden durch das Mitführen einer Kontrollgruppe, welche, anstatt des Allergens oder des AK, PBS appliziert bekam (PBS/PBS) überprüft und diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle dient die Versuchsgruppe, welche gegen OVA immunisiert wurde, aber anstatt des AK PBS erhielt (OVA/PBS). Ein etwaiger Einfluss der reinen AK- Applikation wurde durch eine weitere Kontrollgruppe ausgeschlossen. Diese Versuchsgruppe wurde gegen OVA immunisiert, erhielt aber anstatt des spezifischen AK einen nicht relevanten IgG- AK (Kaninchen) aus der gleichen Spezies wie anti-NGF verabreicht (OVA/IgG).

2.12 Invasive Messung der Lungenfunktion

Die Messung der Lungenfunktionsparameter wurde mithilfe eines Kleintier-Kolbenhub-Respirators durchgeführt. Der Respirator diente bei der Messung der Lungenmechanik als Signalgeber und Messgerät zugleich. Durch die Dislokation des Kolbens wurde das Atemzugvolumen bestimmt. Die Messung des Atemwegdrucks erfolgte über einen *sideport* am Kolben mittels eines Druckwandlers (*pressure transducer*). Durch die Position des Kolbens konnte das zugeführte Volumen, der hierbei aufgewendete Druck, sowie auch die Stromgeschwindigkeit der Atemluft (*flow*) bestimmt werden.

Zu Beginn jedes Experiments wurde eine Zweipunktkalibrierung der Sensoren durchgeführt. Die Kalibrierung der Meßsignale wurde sowohl im offenen wie auch geschlossenen System durchgeführt um Druck- wie auch Volumenänderungen im Schlauchsystem korrigieren zu können.

Die Beatmungsfrequenz wurde bei 120/min volumenkontrolliert und drucklimitiert durchgeführt. Hierbei wurden das Tidalvolumen (TV) der Maus auf 10ml/kg, der maximalen Druck (Pmax) auf 30 cmH₂O und der positive endexpiratorische Druck (PEEP) auf 3 cmH₂O eingestellt.

Das Versuchstier wurde durch die i.p. Injektion von 50 µl einer 5x Narkoselösung anästhesiert. Nach Abflachen der Reflexe wurde die Trachea frei präpariert, über einen Schnitt in die Luftröhre und einer 20-Gauge (G) Stahlkanüle erfolgte die Intubation des Versuchstieres. Die eingeführte Kanüle wurde mittels eines Polyesterfadens fixiert. Anschließend wurde das Tier an den Respirator angeschlossen und beatmet. Um die spontane Atmung und etwaiges Gegenatmen des Versuchstieres zu unterbinden, wurde 50 µl des Muskelrelaxans Esmeron intra muskulär (i.m.) appliziert. Nach Abflachen der spontanen Atmung wurde das Tier zunächst für 5 min ventiliert.

2.12.1 Bestimmung des Atemwegwiderstands und der Lungencompliance

Der Atemwegwiderstand (Resistance, R), wird aus dem Verhältnis der Druckänderung pro Stromgeschwindigkeit der Atemluft (*flow*) berechnet. Durch strukturelle Veränderungen kommt es zu einer Verdickung der Atemwegwand, woraus die Verkleinerung des Atemweglumens resultiert. Somit wird bei der Bewegung des gleichen Volumens in obstruierten Atemwegen ein erhöhter Druck aufgebaut, welcher sich in der Erhöhung des Atemwegwiderstands niederschlägt.

Die *compliance* (C) dient als Maß für die Dehnbarkeit des Gewebes und wird zur Beschreibung der elastischen Eigenschaften der Lunge gebraucht. Die *Compliance* gibt hierbei an, wie viel Volumen man in die Lunge füllen kann, bis der hierbei entstehende Druck um eine Druckeinheit ansteigt. Dieser Parameter stellt also das

Verhältnis zwischen Volumenänderung (ΔV) pro Druckänderung (Δp) dar. Während besonders dehnbare Strukturen eine hohe *compliance* besitzen, zeigen besonders steife Strukturen niedrige Werte. Die Abnahme der *compliance*, wie sie bei der Lungenfibrose beobachtet werden kann, führt zu einer Zunahme der Atemarbeit, da mehr Druck aufgewendet werden muss, um die steife Lunge mit demselben Volumen zu füllen. Für jedes Tier wurden zehn Messungen vorgenommen, die gemittelt wurden.

2.13 Probengewinnung aus Versuchstieren

2.13.1 Serumgewinnung

Für den Nachweis allergenspezifischer AK wurde Versuchstieren über die Schwanzvene Vollblut entnommen. Nach Gerinnung des Blutes bei RT für 45 min, wurde das Serum über einen Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4000 rounds per minute (rpm) vom Koagulat getrennt. Das Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.13.2 Probengewinnung aus der broncho- alveolären Lavage

Die BAL ermöglicht die Gewinnung von Untersuchungsmaterial aus proximalen und distalen Atemwegen. Hierzu wurde nach der Lungenfunktionsmessung der Thorax geöffnet. In die freigelegte Trachea wurde eine 20G Braunüle eingeführt. Dieser wurde eine, mit 1.0 ml PBS/Complete[®] Protease Inhibitor (1Tablette Complete[®]/50ml PBS) gefüllte Insulinspritze, aufgesetzt und die Lunge gespült. Das gewonnene Probenmaterial wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.13.2.1 BAL- Flüssigkeit

Das gewonnene Probenmaterial wurde 10 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, aliquotiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.13.2.2 Bestimmung der Zellzahl in der BAL

Das aus der BAL resultierende Zellpellet wurde in 1 ml PBS/1 % BSA (Bovines Serumalbumin) resuspendiert. Die Zählung der Leukozytenzahl wurde mit einem Casy[®]-Cell-Counter durchgeführt.

2.13.2.3 Herstellung von Zytospins

Mithilfe einer Zytofuge wurden 50 µl der Zellsuspension aus 2.13.2.2 mit 150 µl PBS/ 1 %BSA verdünnt und bei 700 rpm für 5 min auf Objektträger aufgebracht. Nach Lufttrocknung für 30 min wurden die Objektträger zur Differentialbestimmung der Zelltypen angefärbt. Hierzu wurde die DiffQuick® Färbemethode verwendet. Die Objektträger wurden zunächst 1 min in einer Fixierlösung inkubiert, anschließend 1 min in einer Eosinlösung getaucht und zuletzt für 30 Sekunden (sec) in einer Hämatoxylin Lösung gebläut. Die Zytospins wurden nach Waschen in Leitungswasser luftgetrocknet und lichtmikroskopisch, bei 400-facher Vergrößerung, analysiert. Die Unterscheidung der einzelnen Zelltypen geschah anhand der Färbung und der Morphologie.

2.13.3 Organpräparation, Einbettung und Herstellung der Lungenschnitte

2.13.3.1 Organpräparation

Nach Entnahme der BAL wurde der linke Lungenflügel mit einem Polyesterfaden nahe der Bifurkation der Trachea abgebunden und herausgeschnitten. Sie wurde anschließend in 3 ähnlich große Stücke, mit Orientierung zum Hilus der Lunge, geteilt und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden anschließend in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (siehe 2.18.2 RNA- Isolierung).

Der rechte Lungenlappen wurde über die Braunüle mit einer 6 %igen Paraformaldehyd- Lösung (PFA) bis zur vollen Entfaltung befüllt. Die Trachea wurde ebenfalls mit einem Faden abgebunden. Der Lungenflügel wurde heraus präpariert und für weitere 24 h in 6 % igem PFA fixiert. Nach Entfernen der Trachea und des Herzens erfolgte die Einbettung der Lunge in 2 % Agarose. Nach Aushärtung dieser wurde die Lunge, gemäß dem „Systematic Randomized Uniform Sampling“ (SURS), transversal in 6 mm dicke Scheiben geschnitten und in Paraffin eingebettet.

Die Einbettung der Lungen in Paraffin erfolgte im Institut für Pathologie des Klinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg.

2.13.3.2 Herstellung der Lungenschnitte

Aus den in Paraffin eingebetteten Organen wurden mittels eines Mikrotoms 3 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht.

2.14 Histologie und Immunhistochemie

2.14.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) wurde durchgeführt um einen Gesamtüberblick über den Grad der Entzündung und eventuelle pathophysiologische Veränderungen zu erhalten.

Hierzu wurden die Lungenschnitte für 2x 10 min in einem Xylolbad entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 2x 5 min in 100 %-, 5 min 96 %- und 5 min 70 %- Ethanol) rehydriert und anschließend mit Wasser gespült. Es folgte eine Inkubation für 3 min in einer Hämatoxylin- Färbelösung. Die Schnitte wurden für 5 min in Leitungswasser gebläut und anschließend für 2 min in einer Eosin- Färbelösung gefärbt. Nach einem Waschschrift in Aqua dest., wurden die Schnitte dehydriert. Hierzu wurden die Objektträger für 1min in 96 %-, 2x 3 min in 100 % Ethanol und anschließend 2x 10 min Xylol inkubiert. Als Eindeck-Medium wurde Histomount® verwendet.

2.14.2 Periodic-Acid Schiff Färbung

Als ein Charakteristikum des chronischen Asthma bronchiale kann eine verstärkte Schleimproduktion in den Atemwegen beobachtet werden. Der Mukus wird von Becherzellen produziert, welche im gesunden Atemweg nur vereinzelt vorkommen, während der chronischen Atemwegsentszündung sich aber vermehrt aus Klara-Zellen differenzieren. Die Periodic-Acid- Schiff- (PAS) Färbung ermöglicht den Nachweis dieser Zellen im Atemwegsepithel.

Hierzu wurden entparaffinierte und rehydrierte Schnitte (siehe Kapitel 2.14.1) in Aqua dest. gespült und anschließend für 10 min in 0.5 %iger Periodsäure (in Aqua dest.) inkubiert. Es folgte ein Waschschrift für 3 min in Leitungswasser. Die Schnitte wurden kurz in Aqua dest. gespült und für weitere 15 min in Schiffs-Reagenz inkubiert. Nach Waschen in fließendem Leitungswasser für 15 min, folgte die Hämatoxylin Färbung für 1 min. Nach erneutem Waschen in Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 1 min 70 %, 96 % und 100 % Ethanol dehydriert) für 15min in Xylol inkubiert und anschließend eingeckelt.

2.14.3 Färbung von fibrillärem Kollagen

Eine Methode zur Färbung von fibrillärem Kollagen in der Lunge stellt die Sirius Rot Färbung dar. Der Farbstoff lagert sich in die Tripel- Helix-Struktur des

Kollagenmoleküls ein. Als Gegenfärbung wird die *Fast Green* Färbung eingesetzt, welche die Zellen grün erscheinen lässt.

Entparaffinierte und rehydrierte Schnitte wurden in Wasser gewaschen und im Dunkeln für mindestens 24 h in der Färbelösung inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift in Wasser wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und nach dem Xylolbad eingedeckelt.

Die Farbelösung setzte sich wie folgt zusammen: Es wird eine gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung (=1.2 %ig) hergestellt, zu der 0.1 % Fast Green FCF und 0.1 % Sirius Red zugefügt werden.

2.14.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde eingesetzt um eine Verdickung der Atemwegsmuskulatur nach chronischer Allergenexposition nachzuweisen. Als Marker-Protein diente hier α -SMA, welches in glatten Muskelzellen exprimiert wird.

Hierzu wurden Lungenschnitte über 10 minütiges Xylolbad entparaffiniert und 2x5 min in 100 % Ethanol inkubiert. Die endogene Peroxidase wurde durch eine Inkubation für 30 min in 3 % H₂O₂ in Methanol blockiert. Es folgte ein kurzer Waschschrift in Leitungswasser. Antigene wurden über eine Citratpuffer- Behandlung (10 mM Citratpuffer in Aqua dest.) demaskiert. Hierzu wurden die Schnitte 3x5 min bei 450Watt in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf RT wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers wurden durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in PBS für 1 h bei RT belegt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper fand über Nacht bei 4 °C statt. Nach erneutem Waschen wurde der Sekundärantikörper (1:100 in Milchpulver) für 30 min bei RT inkubiert. Es folgten ein Waschschrift und die Beladung des biotinylierten 2. AK mit Streptavidin-Peroxidase Komplexen für erneute 30 min bei RT. Als Substrat wurde *DAB*, welches als brauner Farbton präzipitiert, verwendet. Als Gegenfärbung diente Hämatoxylin. Die Schnitte wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und eingedeckelt.

Die lichtmikroskopischen Analysen und Auswertungen wurden mit einem Olympus BX51 Mikroskop und der Software CellF[®] durchgeführt.

2.15 Quantifizierung der subepithelialen Kollagenschicht

Die Quantifizierung der subepithelial abgelagerten Kollagenschicht wurde an 10 Atemwegen pro Lungenschnitt bei einer Vergrößerung von x400 mittels Lichtmikroskop

ermittelt. Die mittlere arithmetische Verdickung (t_{comp}) wurde als Volumen der respektiven Komponente bestimmt, wobei die Anzahl der Sirius Rot-positiven Ereignisse gezählt wurden. Die Ergebnisse wurden auf die Referenzoberfläche normalisiert, wobei hier die Anzahl der Schnittpunkte mit der Basalmembran gezählt wurden. Die mittlere arithmetische Verdickung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{comp}} = L(\mathbf{P}) \cdot \frac{\sum P_{\text{comp}}}{2 \cdot \sum I_{\text{bl}}}$$

Hierbei repräsentiert $L(\mathbf{P})$ die Länge pro Testpunkt, \mathbf{P}_{comp} steht für die Anzahl der Sirius Rot-positiven Ereignisse und I_{bl} für die Anzahl der Schnittpunkte mit der Referenzoberfläche.

2.16 Zellkulturen

2.16.1 Isolierung primärer Fibroblasten aus der Mauslunge

Fibroblasten exprimieren, im Gegensatz zu unterschiedlichen Immunzellen, keine spezifischen Oberflächenmoleküle, die ihre Isolierung über kommerzielle Kits und Magnet- Beads ermöglichen könnte. Daher wurde die gängige Methode des Gewebeverdaus angewendet, die darauf basiert, dass Fibroblasten im Gegensatz zu Epithel-, Endothel- und glatten Muskelzellen keine gesonderten Kulturbedingungen benötigen und sich als sehr robust erweisen.

Die narkotisierte Maus wurde über einen Schnitt in die Axille entblutet. Anschließend wurde sie auf dem Rücken liegend fixiert, der Brustkorb wurde geöffnet und die Aorta descendens durchtrennt. Anschließend wurde die Lunge über den rechten Herzventrikel mit PBS perfundiert. Anschließend wurde die Lunge heraus präpariert und in PBS aufgenommen. Mit einer Rasierklinge wurde die Lunge in kleine Stücke gehackt und in 5 ml Verdauerpuffer (2 mg/ml CollagenaseD in PBS) aufgenommen. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Lunge mittels eines Gewebehomogenisators (GentlMACS[®]) weiter homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Magnet- Rührfisch wurde zugefügt. Es folgte eine 30 minütige Inkubation auf einem Magnetrührer bei 37 °C. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5 ml FCS gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein Zellsieb filtriert und bei 350 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Vollmedium gewaschen und erneut zentrifugiert. Mittels Magnet-Bead Selektion, den Herstellerangaben folgend, wurden Immunzellen (CD45+) und Endothelzellen (CD31+) aus der Zellsuspension

entfernt. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend in 20 ml Vollmedium (2.7.2) aufgenommen und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die Zellsuspension enthielt neben gewünschten Fibroblasten auch bronchiale Epithelzellen, Pneumozyten und glatte Muskelzellen. Nach 24 h Stunden wurden nicht adhärenente Zellen durch Waschen mit PBS entfernt. Beide Formen der adhärenenten Epithelzellen benötigen spezielle Kulturbedingungen und die Möglichkeit zur Polarisierung. Sind diese nicht gegeben verändern sie entweder ihren Phänotyp zum Fibroblasten oder gehen in Apoptose. Die Zellen wurden durch Zugabe von frischem Medium bis zur Konfluenz kultiviert. Die isolierten Zellen wurden auf die Expression von Kollagen-III und Vimentin getestet und als Fibroblasten eingestuft.

2.16.1.1 Subkultivierung primärer Fibroblasten

Das Medium einer konfluenten 75 cm² Zellkulturflasche wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml 1x Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und anschließend für 5 Minuten bei 350 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Medium aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden 1:2 geteilt, in neue 75 cm² Zellkulturflaschen überführt und erneut bis zur Konfluenz kultiviert. Zellen der Passagen 2 bis 4 wurden für die Experimente eingesetzt.

2.16.1.2 Stimulationsbedingungen für mRNA Expressionsuntersuchungen

Für mRNA- Expressionsuntersuchungen wurden Fibroblasten mit einer Zelldichte von 1x10⁵ Zellen/ml in die Kavitäten einer 6-well Platte ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen für 2h unter Serum-freien Bedingungen synchronisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von rhNGF mit einer Konzentration von 100 ng/ml. Die Stimulation erfolgte für 8 h. Anschließend wurden die Zellen für die RNA- Isolierung gemäß 2.18.2 aufbereitet.

2.16.1.3 Kulturbedingungen für proteinbiochemische Untersuchungen

Für Protein- Expressionsuntersuchungen wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5x10⁵ Zellen/ml in 6 cm- Kulturschalen ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % erfolgte entweder die Proteinisolation (2.17.2) oder Transfektion mit RNAi (2.18.1).

2.16.1.4 Kultivierungsbedingungen zur Bestimmung der Zellvitalität

MLF wurden mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml in die Kavitäten einer 96 well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte mit einem Mediumwechsel die Zugabe des „small molecule inhibitors“ und DMSO für 30 min. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen 2-Mal mit PBS gewaschen und anschließend in Vollmedium kultiviert. Nach 1 h erfolgte die Zugabe des Substrates für die Bestimmung der Zellvitalität gemäß 2.19.

2.16.2 Humane embryonale Nierenepithelzellen (HEK293)

HEK293 Zellen sind mesenchymaler Herkunft und bieten den Vorteil sich durch Transfektion leicht manipulieren zu lassen. Sie wurden in dieser Arbeit für die Bestimmung der Luziferase- Aktivität sowie die Identifizierung der durch NGF aktivierten intrazellulären Signalkaskade eingesetzt.

Da die einzelnen Untersuchungen Medienwechsel benötigen, diese Zellen aber dazu neigen sich vom Plattenboden zu lösen, wurden die eingesetzten Zellkulturplatten mit Poly-L- Lysin für 30 min bei 37 °C beschichtet. Das Lysin wurde anschließend abgenommen und die Platte luftgetrocknet. Ab hier wurden je nach Experiment die HEK293 Zellen in der gewünschten Zelldichte ausgesät.

2.16.2.1 Kulturbedingungen für proteinbiochemische Untersuchungen

Für Untersuchungen zur Proteinexpression und intrazellulären Signalmolekülen wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in die Kavitäten einer 12- well Platte ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ungefähr 50 % wurden diese Zellen mit einem TrkA- kodierenden Plasmid transient transfiziert. Nach ca. 18 h Expression wurden die Zellen zunächst für 2 h unter Serum freien Bedingungen synchronisiert. Zur Untersuchung aktivierter intrazellulärer Signalkaskaden wurden Zellen nach 0, 1, 2, 5, 15, 30 und 60min geerntet und das Gesamtprotein, wie unter 2.17.2 beschrieben, isoliert.

2.16.2.2 Kulturbedingungen zur Bestimmung der Luziferaseaktivität

Zur Bestimmung der Luziferase- Aktivität wurden die Zellen ebenfalls mit der Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in die Kavitäten einer beschichteten 48- well Platte ausgesät. Zuerst erfolgte die Transfektion des NGF- Rezeptors TrkA (siehe oben). Im Anschluss wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen mit den Luziferase Reporterplasmiden transfiziert. Nach 3 h erfolgte die Stimulation der Zellen für 8 h. Die

Zellen wurden anschließend für die Bestimmung der Luziferase- Aktivität, gemäß den Herstellerangaben, aufbereitet.

2.16.2.3 Kulturbedingungen zur Bestimmung der Zellvitalität

HEK293 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml in die Kavitäten einer zuvor mit Poly-L-Lysin beschichteten 96-well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte unter Serum-freien Bedingungen die Zugabe von „small molecule Inhibitoren“, welche in DMSO gelöst vorlagen. Dies sollte die Bedingungen während des Experimentes widerspiegeln. Nach 1 h erfolgte die Zugabe des Substrates für die Bestimmung der Zellvitalität und es wurde wie unter 2.19 beschrieben verfahren.

2.17 Proteinbiochemie

2.17.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

2.17.1.1 Nachweis OVA-spezifischer Immunglobuline

Für den Nachweis der Immunglobuline wurde eine Flachboden- Mikrotiterplatte mit 20µg/ml OVA (Grade VI) in 0.1 M NaHCO₃ pH8.3 beschichtet und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Block-Puffer für 2 h bei RT abgesättigt. Es folgte die Auftragung der Proben. Hierzu wurden Ig-Standards für anti-OVA IgG1 (50 ng/ml-97,66 pg/ml) und anti-OVA IgE (200 ng/ml-195,3 pg/ml) in 10 Verdünnungsschritten hergestellt. Die Verdünnung der Serumproben erfolgte für OVA spezifisches (spez.) IgG1 mit 1:1000 und für OVA spez. IgE mit 1:10. Es wurden 50 µl der Ansätze auf die Platte aufgetragen und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde drei Mal gewaschen und anschließend wurden 50 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers anti- Maus IgG1 und anti-Maus IgE (je 2,5µg/ml) aufgetragen. Die Platte wurde für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl BM blue POD[®]- Substratlösung aufgetragen und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 2M H₂SO₄ gestoppt und bewirkte einen Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption wurde anschließend bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer gemessen und mittels Photometersoftware analysiert.

2.17.1.2 Zytokin- Konzentrationsbestimmung in BALF und Gewebe

Zur Bestimmung der Konzentrationen von aktivem und totalem TGF- β 1 sowie NGF wurden Kits verwendet. Hierbei wurde jeweils nach Herstellerangaben verfahren. Das Detektionslimit der ELISA-Kits lag für TGF β 1 bei > 1,75 pg/ml und für NGF bei >7,8 pg/ml.

Für die Bestimmung der NGF- und TGF β 1- Konzentrationen im Gewebe wurden Gewebestücke, gefroren bei -80 °C, zunächst gewogen und in 1 ml PBS/Complete[®] homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend bei 350 x g zentrifugiert und der zellfreie Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Dieser wurde anschließend mittels ELISA analysiert. Als Negativkontrolle für die ELISA- Bestimmung wurde der Lysepuffer PBS/Complete[®], welcher geringe Mengen an Protein enthält, eingesetzt. Diese Werte wurden von allen Proben abgezogen. Zudem wurde der Gesamt-Proteingehalt in den Proben bestimmt.

Die gemessenen NGF und TGF β 1- Konzentrationen wurden auf den Proteingehalt/mg Gewebe normalisiert.

2.17.2 Protein- Isolation

HEK293- Zellen und MLF wurden nach Stimulation 2x mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml kaltem PBS benetzt und mithilfe eines Zellschabers vom Plattenboden gelöst. Die Pelettierung der Zellen erfolgte bei 350 xg und 4 °C für 5 min. Das Pellet wurde in 500 μ l Lysepuffer (2.7.4) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Das Zellysate wurde durch Sonifikation geklärt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteinfraction enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.17.3 Protein- Fällung und Konzentrationsbestimmung

Dem Zellysate wurden nach Entfernen der Membranbestandteile 4 Volumen Aceton zugefügt (v/v). Der Ansatz wurde für 2 h bei -20 °C inkubiert, wodurch Proteinen die Hydrathülle entzogen wurde und diese ausfielen. Anschließend wurden die Proteine für 10 min bei 14000rpm und 4 °C pelettiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet luftgetrocknet. Dieses wurde anschließend in 50 μ l 1x Lämmli- Puffer gelöst. Die Proteinbestimmung wurde mittels kolorimetrischem Bichinonic- Assay (BCA), den Herstellerangaben folgend, durchgeführt.

2.17.4 Immunpräzipitation

Mithilfe der Immunpräzipitation (IP) können Proteine, die in kleinen Mengen in Zellen vorkommen effizient isoliert werden. Hierzu wird das Protein von Interesse zunächst über einen spezifischen Antikörper gebunden. Der Protein-Antikörper-Komplex wiederum kann über den Einsatz von ProteinA- Agarose, welche IgG Moleküle bindet, präzipitiert werden.

Für die IP wurden 100 µg Gesamtprotein in 500 µl Lysepuffer eingesetzt. Zunächst wurde die Proteinlösung mit 25 µl der ProteinA- Agarose- Lösung für 30 min bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Hierdurch wurden mögliche unspezifische Bindungen der ProteinA- Agarose, welche die spätere spezifische Interaktion des Antikörpers verunreinigen könnten, eliminiert. Die ProteinA- Agarose wurde durch Zentrifugation (14000rpm, 25 s und 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Proteinlösung wurden 2µg des spezifischen Antikörpers hinzu gegeben und der Ansatz wurde für 3 h bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden 25 µl der ProteinA- Agarose Lösung hinzugefügt und der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Agarose pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl Lysepuffer gewaschen und für 20 min bei 4 °C rotierend inkubiert. Es folgte die Pelletierung der Ag- AK- ProteinA Agarose- Komplexe, die Abnahme und Verwerfung des Überstands und Zugabe von 25 µl 1x Lämmli-Puffer. Die Proben wurden für 3 min bei 100 °C aufgeköcht, wodurch die Ag- AK- ProteinA- Agarose- Bindungen gelöst wurden. Der Ansatz wurde bei 14000 rpm für 25s zentrifugiert, wodurch die Agarose pelletiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Ansätze wurden mit 10x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

2.17.5 SDS-Page und Immunoblotting

Proteine wurden über 10 % SDS- Gele aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurden folgende Rezepte verwendet:

Sammelgel:	Trenngel	
720 µl	4.0ml	Acrylamid
1.4 ml	3.0ml	Puffer
2.8 ml	5.0ml	Wasser
20 µl	60µl	10 % Ammoniumpersulfat (APS)
5 µl	6µl	TEMED

Es wurden 20 µg Gesamtprotein oder der IP- Ansatz pro Spur aufgetragen und die Auftrennung der Proteine fand für 2 h bei 80 V statt. Nach Beendigung der Laufzeit wurden die Proteine auf eine PVDF- Membran übertragen. Die Übertragung erfolgte nach dem „SemiDry“ -Verfahren bei 0,8 mA/cm² Gel für 1.5 h. Die Membran wurde anschließend mit einer 5 % Milchpulver in PBS- Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Hierbei wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Primär- AK wurden ü.N. bei 4 °C inkubiert (eingesetzte Verdünnungen siehe Tab 2.6.2). Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 10 min bei RT wurde der Peroxidase gekoppelte Sekundär- AK (Tab. 2.6.3) in 3 % Milchpulver in PBS für 2 h bei RT aufgebracht. Es folgten zwei Waschschriffe mit TBST für 10 min. Zuletzt wurde die Membran 10 min in TBS gewaschen. Es folgte die Auftragung der Substrat-Lösung (Luminol) für 4 min. Immunoreaktive Banden wurden über Röntgenfilme detektiert.

2.18 Molekularbiologische Methoden

2.18.1 RNA-Interferenz (RNAi)

Der Einsatz von siRNA ermöglicht das Ausschalten von Zielgenen auf mRNA Ebene. MLF wurden in 6well Platten mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Bei Erreichen der 70-80 %igen Konfluenz erfolgte die Transfektion. Der Ansatz wurde in FCS- freiem Medium angesetzt. Als Transfektionsreagenz wurde HiPerfect (Qiagen) verwendet und für die Herstellung des Ansatzes wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Der Ansatz wurde kurz gevortext und anschließend zur Komplexbildung für 10 min bei RT inkubiert. Es wurden 400 µl des Transfektionsansatzes Tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 4 h wurde das Medium abgesaugt und gegen frisches Vollmedium ersetzt.

2.18.2 RNA- Isolierung, DNA- Verdau und Erststrang copy-DNA Synthese

Die Aufreinigung von RNA aus Gewebe oder Zellsuspensionen wurde mittels eines RNeasy[®] Mini Kits gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde mit 25 µl RNA- freiem Wasser eluiert.

Um die RNA kontaminierende DNA zu entfernen wurde ein DNaseI- Verdau durchgeführt. Hierzu wurden zur eluierten RNA 2.5 µl 10x DNaseI Reaktionspuffer und 1 µl DNaseI hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 µl EDTA und eine weitere Inkubation für 10 min bei 65 °C. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch. Dazu wurde die RNA- Probe 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurde über die

Absorption der Probe bei 260 nm die RNA- Konzentration ermittelt. Die gleichzeitige Absorptionsmessung bei 280 nm, welche der Detektion von Proteinen dient, ermöglichte die Bildung des Quotienten der Absorptionen bei 260 nm/280 nm und erlaubt eine Aussage über die Reinheit der RNA-Präparation. Bei guten Präparationen liegt dieser Wert zwischen 1.8 und 2.0.

Es wurden 500 ng der gereinigten RNA für die Erst-Strang copyDNA- Synthese (cDNA) eingesetzt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Omniscript®- Kit verwendet. Um die Umschreibung von vollständigen mRNA in cDNA zu gewährleisten, wurde als Primer ein Oligomer bestehend aus 18 Thymidinen (Oligo-dT) gewählt, welcher an Poly-A- Schwänze der mRNA bindet und so der Polymerase einen Startpunkt bietet. Folgender Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und anschließend 5 min 93°C inkubiert.

Ansatz:

x µl	RNA (500 ng)
2 µl	10x Reaktionspuffer
2 µl	dNTPs (5 nM)
1 µl	Oligo-dT Primer
1 µl	Omniscript Reverse Transkriptase
y µl	RNase- freies Wasser
<hr/>	
20 µl	

Die cDNA wurde für anschließende qualitative sowie quantitative Polymerase- Ketten- Reaktionen (PCR) eingesetzt.

2.18.3 Quantitative Real-Time Polymerase- Ketten- Reaktion (RT-PCR)

Die Quantifizierung der relativen Expression der mRNAs wurde mittels RotorGene3000 durchgeführt. Dazu wurden 0.5 µg DNA Probe als Matrize für die PCR verwendet. Diesem Ansatz wurden 5 µl 2-fach QuantiTect SYBR® Green PCR Master Mix sowie 0.5 µl 10 pM Forward bzw. Revers Primer für die entsprechenden Gensequenzen hinzugefügt. Insgesamt wurden zur Analyse 45 Zyklen durchgeführt. Dabei betrug die Denaturierungstemperatur 94 °C, die Annealingtemperatur 57 °C und die Extensionstemperatur 72 °C.

Die relative Expression normalisiert auf L32 wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet.

2.18.4 DNA- Isolierung und Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde aus Mausschwanzspitzen DNA isoliert. Das Gewebe wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur DNA- Isolation wurde das E.Z.N.A[®]- Kit der Firma Peqlab verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die DNA wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Genotypisierungs- PCR NGF-Tg- Mäuse wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz	Temperaturprofil
10 µl 2x Red Taq Ready Mix	94 °C 5 min
1 µl Primermix (forward und reverse)	94 °C 30 s
4 µl Wasser	60 °C 45 s
5 µl DNA	72 °C 30 s
20 µl	72 °C 5 min
	4 °C

35 Zyklen

Für die Genotypisierung für p75^{exonIII -/-} - Mäuse wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz	Temperaturprofil
10 µl 2x Red Taq Ready Mix	94 °C 3 min
2 µl Primermix (oIMR0013, 0014, 0710 ,0711)	94 °C 20 s
3 µl Wasser	64 °C 30 s
5 µl DNA	72 °C 35 s
20 µl	94 °C 20 s
	58 °C 30 s
	72 °C 35 s
	72 °C 2 min
	4 °C

-0,5 °C pro Zyklus;
12 Zyklen

25 Zyklen

Die PCR- Proben wurden anschließend über ein 1.5 %iges DNA- Agarose Gel, welches Ethidiumbromid enthält, aufgetrennt und durch UV-Belichtung wurden die Banden sichtbar gemacht. Die Expression des Transgens für NGF wurde durch das Vorhandensein einer Bande der Größe von 311 bp nachgewiesen. Mäuse, welche das Wildtyp- Gen für p75^{NTR} tragen wiesen eine Bande der Größe von 345 bp auf, der *knock out* zeigte sich durch das Vorhandensein einer Bande von 280 bp. Diese verkürzte Bande entsteht durch die Deletion des dritten Exons im p75^{NTR}- Gen. Heterozygote Mäuse wiesen beide Banden auf.

2.18.5 Generierung der Kollagen 3- Promotorfragmente

2.18.5.1 Amplifizierung der zu untersuchenden Genabschnitte

Die genomische DNA wurde aus Mausfibroblasten isoliert (2.16.1). Für die Amplifizierung der unterschiedlichen Promotorabschnitte wurden die Primer aus Tab. 2.5.2 verwendet. Für die PCR- Reaktion wurde folgender Ansatz pipettiert, der das nebenstehende Temperaturprofil durchlief:

PCR-Ansatz:	Temperaturprofil:
25 µl HotStar <i>Taq</i> -Polymerase Mix	95 °C 15 min
1 µl Forward Primer (100 pmol)	94 °C 45 s
1 µl Reverse Primer (100 pmol)	T _m °C 55 s
18 µl Wasser	72 °C 1 min pro kb
5 µl genomische DANN	72 °C 10 min
<hr/> 50 µl	4 °C

40 Zyklen

2.18.5.2 Aufreinigung des PCR-Produktes

Das PCR-Produkt wurde mittels Qiaquick PCR-Purification Kit[®] (Qiagen) aufgereinigt. Hierzu wurde nach Herstellerangaben verfahren und die DNA in 30 µl Wasser eluiert.

2.18.5.3 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Das PCR-Produkt wurde über ein Ethidiumbromid haltiges 1 %iges DNA- Agarose Gel aufgetrennt. Die Produkte wurden mittels UV-Licht sichtbar gemacht, mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Aufreinigung wurde das Qiaquick Gel-Purification[®] Kit der Firma Qiagen verwendet. Für die Aufreinigung wurden die Herstellerangaben verfolgt und die DNA in 30 µl Wasser eluiert.

2.18.5.4 TA Klonierung

Die *Taq*- Polymerase, welche die Aktivität einer terminalen Transferase besitzt, synthetisiert ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produktes. Dieses kann einfach in den pCR[®]2.1-TOPO[®]- Vektor, welcher Überhänge mit einzelnen 3'-Desoxythymidinen (T) besitzt, über die kovalent gebundenen Topoisomerasen ligiert werden.

Der Ansatz wurde folgendem Schema nach angesetzt und für 10 min auf Eis inkubiert:

1 μ l	TOPO PCR2.1 Vektor
1 μ l	Salt-Solution
1 μ l	PCR-Produkt
2 μ l	Wasser
<hr/>	
5 μ l	

2.18.5.5 Ligation

Die Enden von Nukleinsäure-Molekülen können durch DNA-Ligasen verknüpft werden, die unter Verbrauch von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe katalysieren. Zwei beliebige dsDNA-Moleküle mit freien kompatiblen 5'- und 3'-Enden können auf diese Weise kovalent zusammengefügt werden.

Für einen 20 μ l Ligationsansatz wurden eingesetzt:

1 μ l	Plasmid
3 μ l	Fragment
2 μ l	Ligasepuffer
1 μ l	T4 Ligase (10 U/ μ l)
13 μ l	Wasser
<hr/>	
20 μ l	

Als Reportervektor wurde der pGL4.10[®] der Firma Promega eingesetzt. Dieser Vektor besitzt keinen eigenen Promotor, kodiert aber für die Firefly Luziferase. Der Reporterkassette ist eine „multiple cloning site“ (MCS) vorgeschaltet, in welche die einzelnen Promotorregionen kloniert wurden. Hierzu wurde der Vektor über die KpnI- und XhoI- Schnittstellen in der MCS geöffnet. Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

1 μ g	pGL4.10
3 μ l	10x Reaktionspuffer
1 μ l	KpnI Fast Digest
1 μ l	XhoI Fast Digest
X μ l	Wasser
<hr/>	
20 μ l	

Der gleiche Ansatz wurde für die Promotorfragmente in TOPO PCR2.1 angesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Auftrennung über ein 1 %iges DNA- Agarose- Gel. Die Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA aufgereinigt und in 25 μ l Wasser eluiert.

Für die Ligation der Fragmente in den Reportervektor wurde folgender Ansatz pipettiert:

1 µg	Reporter-Plasmid
3 µl	Fragment
2 µl	Ligasepuffer
1 µl	T4 Ligase
x µl	Wasser
<hr/>	
20 µl	

2.18.5.6 Transformation chemisch kompetenter E.coli

Eine Portion chemisch kompetenter OneShot TOP10[®] Bakterien wurde für 15 min auf Eis aufgetaut. Es folgte die Zugabe von 1 µl des Ligationsansatzes. Die Zellen wurden für weitere 10 min auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Die Bakterien wurden auf einer LB- Ampicillin (100 µg/ml)- Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.18.6 Plasmidpräparation

2.18.6.1 Plasmidpräparation in kleinem Maßstab

Für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid- DNA wurden einzelne Klone von Selektionsplatten steril gepickt und in ein mit 3 ml LB-Ampicillin-Medium (75 µg/ml Ampicillin) vorbereitetes Röhrchen überführt. Diese Kultur wurde im Anschluss schüttelnd bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei erfolgreicher Vermehrung der Bakterien wurden 1.5ml Zellsuspension der Kultur bei 14000 x g zentrifugiert und anschließend gemäß den Herstellerangaben (QIAprep Spin Mini- Prep[®] Kit, Firma Qiagen) aufbereitet. Die Plasmid- DNA wurde mit 35 µl Wasser eluiert.

2.18.6.3 Plasmidpräparation in großem Maßstab

Für die Herstellung von großen Mengen an Plasmid- DNA wurde zunächst eine Vorkultur angeimpft. Hierzu wurde 10 µl der Übernachtskultur zu 5 ml LB- Medium (75 µg/ml Ampicillin) gegeben. Die Kultur wurde für mindestens 8 h bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 150 µl in 150 ml LB- Medium (75 µg/ml Ampicillin) überführt und ü.N. bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für die Plasmidpräparation wurde das HiSpeed Plasmid Maxi[®] Kit verwendet. Hierzu wurde

die Kultur auf 50 ml Falcon- Gefäße aufgeteilt und für 20 min und 4 °C bei 6000 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und alle Pellets eines Ansatzes wurden in insgesamt 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Ab hier wurden den Herstellerangaben gefolgt. Die Elution der Plasmid- DNA erfolgte mit 500 µl Wasser. Die Reinheit und Menge der isolierten DNA wurden spektrophotometrisch bei 260/280 nm bestimmt.

2.18.7 Sequenzierung der Promotorfragmente

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma AGOWA durchgeführt. Mithilfe des NCBI Blast Software wurden die Sequenzen mit der Originalsequenz des Kollagen 3 Promotors verglichen um Mutationen auszuschließen.

2.18.8 Transiente Transfektion

Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % erfolgte die Transfektion.

Der Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

50 µl Medium ohne FCS
x µg Plasmid- DNA
y µl FuGeneHD Transfektionsreagenz (Ratio 4:2 (µl:µg))

Der Ansatz wurde gemischt und zur Komplexbildung für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50 µl des Ansatzes pro well pipettiert. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 %CO₂ kultiviert.

2.18.9 Bestimmung der Luziferase- Aktivität

HEK293 Zellen wurden mit 2x 1 ml PBS gewaschen, anschließend für die passive Lyse in 65 µl 1x Lysepuffer aufgenommen und für 15 min rotierend bei RT inkubiert. Für die effektive Zelllyse wurden diese bei -20 °C eingefroren. Es folgte das Auftauen der Zellen und anschließende Klärung des Zelllysats. Für die Bestimmung der Luziferase- Aktivität wurde das *Dual- Luciferase Reporter Assay System*[®] verwendet. 20 µl des Lysats wurden in eine Kavität einer 96 well Flachboden- Platte überführt. Durch Zugabe von 50 µl des Luziferase Aktivierungsreagenz II (LARII[®]) wurde die Oxidation von Luziferin durch die Firefly Luziferase in Oxyluziferin+ AMP+ PP_i+ CO₂ und Licht katalysiert. Die Lumineszenz wurde mit einem Photometer bestimmt. Diese Reaktion wurde durch Zugabe des Stop & Glo[®] Reagenz abgestoppt. Dieses Reagenz enthält

das Substrat der Renilla Luziferase Coelentrazine und katalysierte somit die Lichtemission durch die Umsetzung des Coelentrazin in Coelenteramid + CO₂+ Licht. Die Lumineszenz wurde ebenfalls mit einem Photometer gemessen. Die relative Lumineszenzeinheiten (RLU) ergaben sich aus dem Verhältnis beider Lumineszenzen zueinander.

2.19 Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde mittels eines kolorimetrischen Nachweisverfahrens, welches auf der Bildung des Farbstoffes Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen aus einem nicht-farbigem Substrat, 3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz (MTS), beruht. Die Aktivität der mitochondrialen Enzyme setzt lebende Zellen voraus und korreliert mit dem Aktivierungsstatus dieser. Das entstehende Formazanprodukt ist in wässrigen Lösungen löslich, so dass das kontinuierlich entstehende Produkt im Zellkulturmedium photometrisch, bei 490 nm mittels eines Plattenreaders, quantifiziert werden kann. Die gemessene Absorption stellt ein gutes Maß für den Stoffwechselstatus der Zellen dar. Es wurde der *CellTiter 96[®] AQueous One Cell Solution Cell Proliferation Assay[®]* der Firma Promega verwendet.

2.20 Statistische Analysen

Alle in Balkendiagrammen dargestellten Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. In den *Box- and Whisker- Plots* sind der Median und die Perzentilen (10., 25., 50. (Median), 75. und 90.) dargestellt. Für die graphische und statistische Auswertung, sowie die Berechnung der Signifikanz wurden die Softwarepakete Excel[®] und GraphPad Prism[®] verwendet. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit einem ungepaarten t- test berechnet, der Vergleich unterschiedlicher Behandlungsgruppen wurde mittels der Analyse der Varianz (ANOVA)- Test berechnet. Ergebnisse für $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kinetik der NGF-Spiegel in der allergischen Atemwegsentzündung *in vivo*

3.1.1 Erhöhte NGF-Spiegel begleitend zu strukturellen Veränderungen in der chronisch allergisch entzündeten Lunge

Die subepitheliale Fibrose stellt ein Charakteristikum der strukturellen Veränderungen im chronischen Asthma bronchiale dar. Die wiederholte Provokation mit einem Aeroallergen vermittelt einen beständigen Entzündungsreiz, der die Produktion epithelialer Wachstumsfaktoren aufrecht erhält. Um NGF eine Rolle bei der Fibrosierung der Atemwege zuschreiben zu können, wurden die NGF-Spiegel in Modellen der akuten und der chronisch allergischen Atemwegsentzündung untersucht. Hierfür wurden C57BL/6- Mäuse, wie unter 2.11.2 beschrieben, mit OVA/Al(OH)₃ systemisch immunisiert und, nach Ausbildung der adaptiven Immunantwort, mit einem OVA- Aerosol über die Atemwege provoziert (Abb. 5A). Die Provokation wurde hierbei an zwei aufeinander folgenden Versuchstagen pro Woche durchgeführt. Analysiert wurden Versuchstiere, die 1 und/oder 4 Wochen mit dem Allergen provoziert wurden. Die Analysezeitpunkte wurden hierbei so gewählt, dass nach Auslösen der akuten Atemwegsentzündung mindestens ein abgeschlossener Reparaturzyklus, von 28 Tagen (Sonar, et. al. 2010), bei wiederholter Induktion des Gewebeschadens, durchlaufen wird. Für die Analyse wurden die Atemwege der Versuchstiere lavagiert (2.13.2.1) und die NGF-Spiegel wurden in der Zellfreien Lavage der Tiere bestimmt (2.17.1.2).

Es zeigte sich hierbei, dass in Kontroll (PBS)- Mäusen die NGF-Spiegel mit $14,0 \pm 10,05$ pg/ml sehr niedrig vorlagen und sich damit am unteren Detektionslimit des eingesetzten Kits von $7,8$ pg/ml befanden. Die Kurzzeitprovokation mit OVA (akut) führte zu einer deutlichen Erhöhung der NGF-Konzentration in den Atemwegen mit $95,08 \pm 29,66$ pg/ml und konnte durch wiederholte Provokationen (chronisch) auf $375,40 \pm 189,68$ pg/ml gesteigert werden (Abb. 5B).

Charakteristika der chronisch allergischen Atemwegsentzündung sind die Atemwegsentzündung und strukturelle Veränderungen in den Atemwegen. Strukturelle Veränderungen sind in Modellen der akuten Atemwegsentzündung auf Grund der Kurzweiligkeit des Entzündungsprozesses noch nicht ausgebildet (Nials and Uddin, 2008). Um zu untersuchen, ob nach 4- wöchiger Allergenprovokation diese sich in der C57BL/6-Maus ausbilden, wurden zum einen die Gesamtzellzahlen (2.13.2.2) sowie

Zelltypen (2.13.2.3) in der Lavage bestimmt. Die Lungen wurden entnommen und für die Histologie aufbereitet (2.13.3.1). Für den Nachweis von Becherzellen wurden PAS-Färbungen (2.14.2) angefertigt. Fibrilläres Kollagen wurde mit einer Sirius Rot-Färbung (2.14.3) angefärbt. Zur Untersuchung der Muskelzellschichtdicke wurden immunhistochemische Färbung für α -SMA durchgeführt (2.14.4). Verglichen wurden hierbei Kontroll- und chronisch provozierte Mäuse.

Die Analyse der Entzündung in den Atemwegen zeigte, dass die Allergenprovokation einen hochsignifikanten Einstrom von Entzündungszellen zur Folge hatte. Die Anzahl der Leukozyten stieg von $1,18 \pm 0,22 \times 10^5$ Zellen/ml in unbehandelten Tieren auf $4,46 \pm 0,73 \times 10^5$ Zellen/ml in mit OVA provozierten Mäusen an. Die Bestimmung der einzelnen Immunzellpopulation zeigte deutlich, dass dieser Anstieg nicht durch die Rekrutierung von Makrophagen verursacht wurde, da ihre Anzahl nach Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung mit $1,42 \pm 0,34 \times 10^5$ Zellen/ml sich im Vergleich zu naiven Tieren mit $1,26 \pm 0,81 \times 10^5$ Zellen/ml nicht unterschied. Es war allerdings, wie zu erwarten, eine starke Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Atemwege zu beobachten. Während in naiven Mäusen keine eosinophilen Granulozyten zu detektieren waren, wiesen OVA-behandelte Mäuse $2,82 \pm 0,6 \times 10^5$ Zellen/ml BAL auf. Durch die Immunisierung und Provokation war ebenfalls ein Anstieg der Lymphozytenanzahl detektierbar. Obwohl die Zellzahlen sehr gering waren, war eine Verdopplung der Lymphozytenzahlen zu beobachten, so dass die Zellzahlen von $2,0 \pm 1,0 \times 10^3$ Zellen/ml in unbehandelten Mäusen auf $7,0 \pm 4,0 \times 10^3$ Zellen/ml anstiegen. Auch die deutlich verstärkte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege war zu beobachten, so dass eine Zunahme der Zellen von nicht nachweisbar auf $3,2 \pm 1,0 \times 10^3$ Zellen/ml zu beobachten war (Abb. 5C).

Die Untersuchung der Gewebeentzündung verdeutlichte, dass OVA behandelte Mäuse ein starkes perivaskuläres und peribronchiales Infiltrat aufwiesen. In Allergen provozierten Mäusen waren darüber hinaus Schleim produzierende Zellen nachweisbar (Abb. 5D PAS). Diese Mäuse wiesen zudem eine verdickte subepitheliale Kollagenschicht (Abb. 5C SiriusRot) und eine Verdickung der Muskelzellschicht (Abb. 5D α SMA) auf.

Insgesamt zeigte sich, dass im verwendeten C57BL/6- Stamm, nach erfolgter systemischer Immunisierung, die Allergenprovokation für 4 Wochen ausreichte um alle Charakteristika der chronisch allergischen Atemwegsentzündung in diesem Modell abzubilden und diese strukturellen Veränderungen von stark erhöhten NGF-Konzentrationen begleitet wurden.

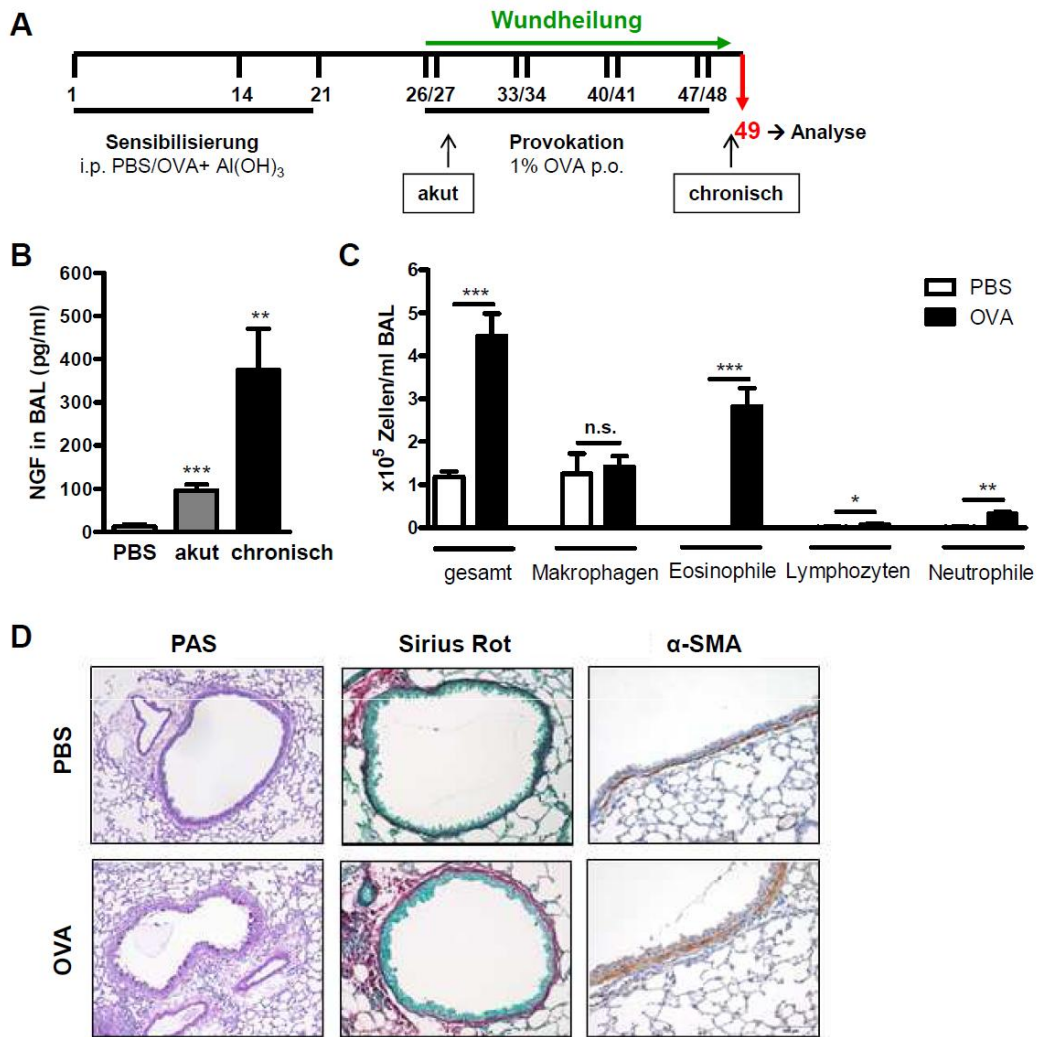


Abb.5 Strukturelle Veränderungen in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung werden von erhöhten NGF- Konzentrationen begleitet.

(A) Modell zur Induktion einer akuten und chronisch allergischen Atemwegsentzündung nach systemischer Immunisierung mit 10 μ gOVA/1,5mg Al(OH)₃ und OVA-Provokation (1 %OVA in PBS) für 1 und 4 Wochen. (B) 24h nach letzter Allergenprovokation wurden die NGF-Konzentrationen in der zellfreien broncho-alveolären Lavage (BAL) von Kontroll (PBS)-, sowie akut und chronisch OVA exponierten Mäusen mittels ELISA bestimmt. (C) In der BAL von PBS- und chronisch Allergen exponierten (OVA)- Mäusen wurde die Gesamtzellzahl und auf *DiffQuick*® gefärbten Zytospins wurden die einzelnen Leukozytenpopulationen anhand ihrer Morphologie bestimmt. (D) Repräsentative Histologie und Immunhistochemie von PBS- und OVA-chronisch Mäusen gefärbt mit PAS (Vergrößerung x100), Sirius Rot (x200) und α -smooth muscle actin (α SMA) (x400). Die Werte von n=5 pro Gruppe sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. PBS behandelte Gruppe.

3.2 Einfluss von NGF auf die Kollagen-III- Expression *in vitro*

3.2.1 NGF induziert die Kollagen-III- Expression in Lungenfibroblasten

Kollagene werden von mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten und Myofibroblasten, produziert. Diese Zellen sind direkt unterhalb der BM des Atemwegepithels lokalisiert und werden bei einer Verletzung des Epithels durch freigesetzte Wachstumsfaktoren zur Bildung einer provisorischen Matrix für die epitheliale Proliferation aktiviert. Als Hauptbestandteil dieses, wird Kollagen III, welches aus drei identischen col3(α 1)-Ketten besteht, sezerniert. Anhand primärer Fibroblasten aus der Mauslunge, welche die Hauptpopulation Kollagen synthetisierender Zellen darstellen, sollte untersucht werden, ob NGF die col3(α 1)- Expression *in vitro* induzieren kann.

Zunächst wurde die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} in Lungenfibroblasten aus der Maus (*mouse lung fibroblasts*, MLF) untersucht. Hierzu wurden MLF, wie unter 2.16.1 isoliert und nach 2.17.2 wurde das Gesamtprotein isoliert. Mittels immunologischer Detektion nach Western blot konnte in zwei unterschiedlichen MLF-Isolaten die Expression beider NGF-Rzeptoren, TrkA und p75^{NTR} bestätigt werden (Abb. 6A).

Im Anschluss wurde in MLF die Beeinflussung der col3(α 1)- Expression durch NGF- untersucht. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.16.1.3 ausgesät. Nach Synchronisierung der Zellen wurden diese mit NGF (100 ng/ml) in Medium versetzt mit 0,5 % FCS über einen Zeitraum von 8 h stimuliert. Die Stimulation in Serum reduzierten Medium sollte den Einfluss des pro-fibrotischen TGF β 1, welches im FCS in erhöhten Mengen vorliegt, ausschließen. Der Zeitraum von 8 h wurde gewählt um einen direkten Effekt auf die mRNA- Expression zu untersuchen. Als Kontrolle (control) wurden in 0,5 % FCS- haltigen Medium kultivierte Zellen, ohne zusätzlichen exogenen Stimulus, mitgeführt. Die Zellen wurden anschließend für die RNA- Isolierung geerntet und bis zur Herstellung der cDNA verarbeitet (2.17.2). Anschließend wurde mittels RT-PCR die relative Expression der col3(α 1)-Kette bestimmt. Die Werte wurden auf die Expression des *housekeeping* Gens L32 normalisiert.

Hierbei zeigte sich, dass die exogene Gabe von NGF in Fibroblasten einen starken Anstieg in der col3(α 1)- mRNA induzierte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die col3(α 1)- Expression in NGF- stimulierten Zellen um das 3-fache erhöht (Abb. 6B).

Somit ließ sich schließen, dass die erhöhten NGF-Konzentrationen in der chronisch allergisch entzündeten Lunge in Fibroblasten die Expression von col3(α 1) induzieren können.

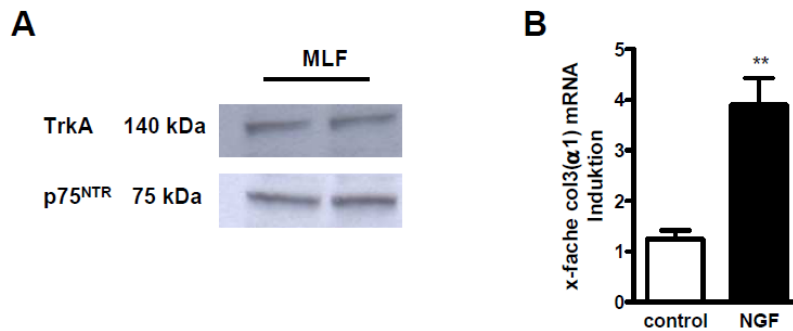


Abb.6 NGF induziert die col3(α1)- mRNA Expression in primären Lungenfibroblasten aus der Maus *in vitro*.

(A) Fibroblasten aus der Mauslunge (MLF) wurden isoliert und auf die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} untersucht. (B) Die col3(α1) mRNA- Expression wurde in Kontroll (control)- und NGF stimulierten Zellen mittels RT-PCR erfasst und auf das *housekeeping* Gen L32 normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM mit n=5, **p<0.01 gegenüber Kontrolle.

3.3 Auswirkungen der NGF- Neutralisierung auf die subepitheliale Fibrosierung in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung *in vivo*

Um die gewonnenen *in vitro* Daten auf das *in vivo* Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung übertragen zu können, also die Beteiligung von NGF an der Ausbildung der bronchialen Fibrose zu verifizieren, sollte im Folgenden die biologische Aktivität des stark erhöhten NGF gehemmt werden. Zur Neutralisierung von NGF wurde ein neutralisierender rabbit- anti-NGF AK, der zuvor in Zellkulturexperimenten eine neutralisierende Wirkung gezeigt hatte, eingesetzt. Um einen eventuellen Verlust der AK- Menge bei *intra nasaler* Gabe, durch Würgereiz des Tieres und anschließendem Schlucken, vermeiden zu können, wurde die *i.p.* Route für die AK- Applikation gewählt. In einem Vorversuch wurden die Bedingungen zur präventiven Gabe von anti-NGF bestimmt.

3.3.1 Die systemische Neutralisierung beeinflusst nicht die Antigen-spezifische Antikörperproduktion

Um spezifisch den Einfluss von NGF auf die chronische Atemwegsentzündung zu untersuchen, und nicht die systemische Immunisierung der Versuchstiere zu beeinflussen, wurde der neutralisierende anti-NGF- AK erst nach abgeschlossener Immunisierung, präventiv 24 h vor jeder Aerosolprovokationsphase, mit 10 µg/200 µl PBS pro Tier *i.p.* verabreicht (Abb.7A). Um den Effekt von NGF oder die Auswirkung

der Neutralisierung von NGF klassifizieren zu können, wurden insgesamt 4 Gruppen in den Versuch eingeschlossen. Die PBS/PBS- Gruppe wurde mit PBS+ Alum immunisiert, mit PBS provoziert und mit 200µl PBS behandelt und diente als Negativkontrolle. Die drei OVA- Gruppen wurden alle mit OVA+ Alum immunisiert und einem OVA- Aerosol ausgesetzt, aber unterschiedlich behandelt. Die als Positivkontrolle dienende Gruppe OVA/PBS entwickelte den Asthma-Phänotyp und wurde mit PBS behandelt. Um einen Nebeneffekt der reinen AK-Applikation ausschließen zu können, wurde die Versuchsgruppe OVA/IgG, welche einen nicht relevanten AK aus der gleichen Spezies wie anti-NGF erhielt, mitgeführt. Die Versuchsgruppe OVA/anti-NGF sollte zeigen, welche der Charakteristika in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung von bioaktivem NGF abhängig waren. Die Behandlung und die Provokation wurden für vier Wochen durchgeführt. 24 h nach der letzten Allergenprovokation wurde für die anschließende Analyse Blut aus der Schwanzvene der Versuchstiere entnommen und die AK- Titer im Serum bestimmt (2.17.1.1). Gemessen wurden die Titer für die allergenspezifischen AK der Subklassen IgE und IgG1 (OVA IgE und OVA IgG1).

Hierbei zeigte sich, dass alle OVA-Versuchsgruppen eindeutige OVA-spezifischen AK-Titer aufwiesen, die sich zwischen den OVA- Gruppen nicht signifikant unterschieden. Die OVA IgE-Titer lagen in der OVA/PBS- Gruppe bei $15,84 \pm 9,21$ ng/ml. Im Vergleich hierzu wies die OVA/IgG- Gruppe einen Titer von $13,57 \pm 6,28$ ng/ml und die mit anti-NGF behandelte Versuchsgruppe einen Titer von $17,14 \pm 12,03$ ng/ml auf. In der Negativkontrolle, PBS/PBS, waren keine OVA IgE- AK zu detektieren. Die OVA spezifische IgG1- Titer lagen in der OVA/PBS- Gruppe bei $172,99 \pm 82,50$ µg/ml, in der OVA/IgG- Gruppe bei $195,82 \pm 55,98$ µg/ml und wurden durch die anti-NGF Gabe nicht beeinflusst. In dieser Versuchsgruppe lagen sie bei $195,73 \pm 132,26$ µg/ml (Abb.7B).

Hieraus wurde geschlossen, dass, trotz der systemischen anti-NGF Gabe, die adaptive Immunantwort gegen das Allergen OVA in allen Versuchsgruppen ausgebildet war. Daraus wurde geschlossen, dass die Versuchstiere in der Lage gewesen sein sollten, wiederholt auf den Allergenkontakt eine IgE- vermittelte Atemwegsentzündung auszubilden, die in der chronischen Phase die Bildung der subepithelialen Fibrose induzieren sollte.

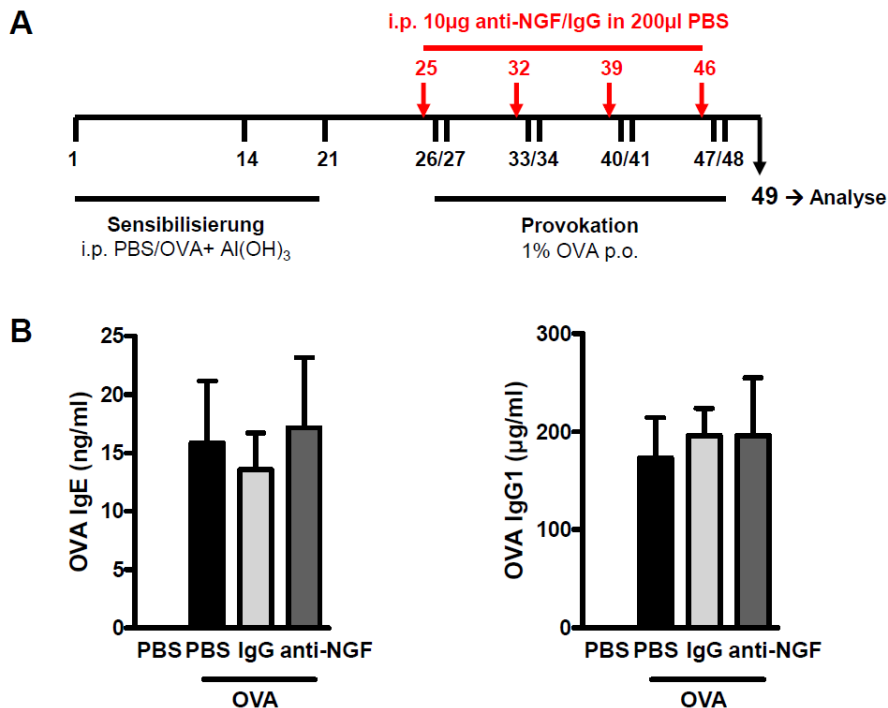


Abb.7 Die systemische NGF- Neutralisierung beeinträchtigt nicht den Immunisierungsstatus.

(A) Versuchsprotokoll zur Neutralisierung von NGF in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung. (B) Systemische Titer von OVA- IgE und -IgG1 24h nach letzter Allergenprovokation. Die PBS/PBS- Gruppe dient als Negativkontrolle. Alle OVA- Gruppen wurden gegen OVA immunisiert und mit OVA provoziert. Die OVA/PBS Gruppe dient als Positivkontrolle und bekam anstelle des AK PBS appliziert. Die OVA/IgG- Gruppe bekam einen nicht relevanten AK verabreicht. Die OVA/anti-NGF Gruppe erhielt einen neutralisierenden AK. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=5 pro Gruppe.

3.3.2 Verminderte Fibrosierung der Atemwege nach systemischer anti-NGF Applikation

Die subepitheliale Fibrose ist durch die Bildung und Ablagerung von retikulärem BG gekennzeichnet. Um zu untersuchen, ob die Neutralisierung von NGF einen Effekt auf die Kollagenablagerung hatte, wurden die Lungen der Versuchstiere für die Histologie aufbereitet (2.13.3.1). Für den Nachweis von fibrillärem Kollagen wurde an Schnitten die Sirius Rot- Färbung (2.13.3) durchgeführt und anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet.

Es zeigte sich, dass im Vergleich zur PBS/PBS- Gruppe die subepitheliale Kollagenschicht in der OVA/PBS deutlich ausgeprägt war. Die OVA/IgG Gruppe unterschied sich kaum von der OVA/PBS- Gruppe. Im Vergleich hierzu war eine deutlich dünnere Kollagenschicht in anti-NGF behandelten Mäusen zu erkennen. (Abb. 8A).

Um den histologischen Befund zu unterstützen, wurde der Histologie eine Quantifizierung der Kollagenschichtdicke an SURS angeschlossen. Diese wurde mittels Mikroskopsoftware bestimmt (2.15).

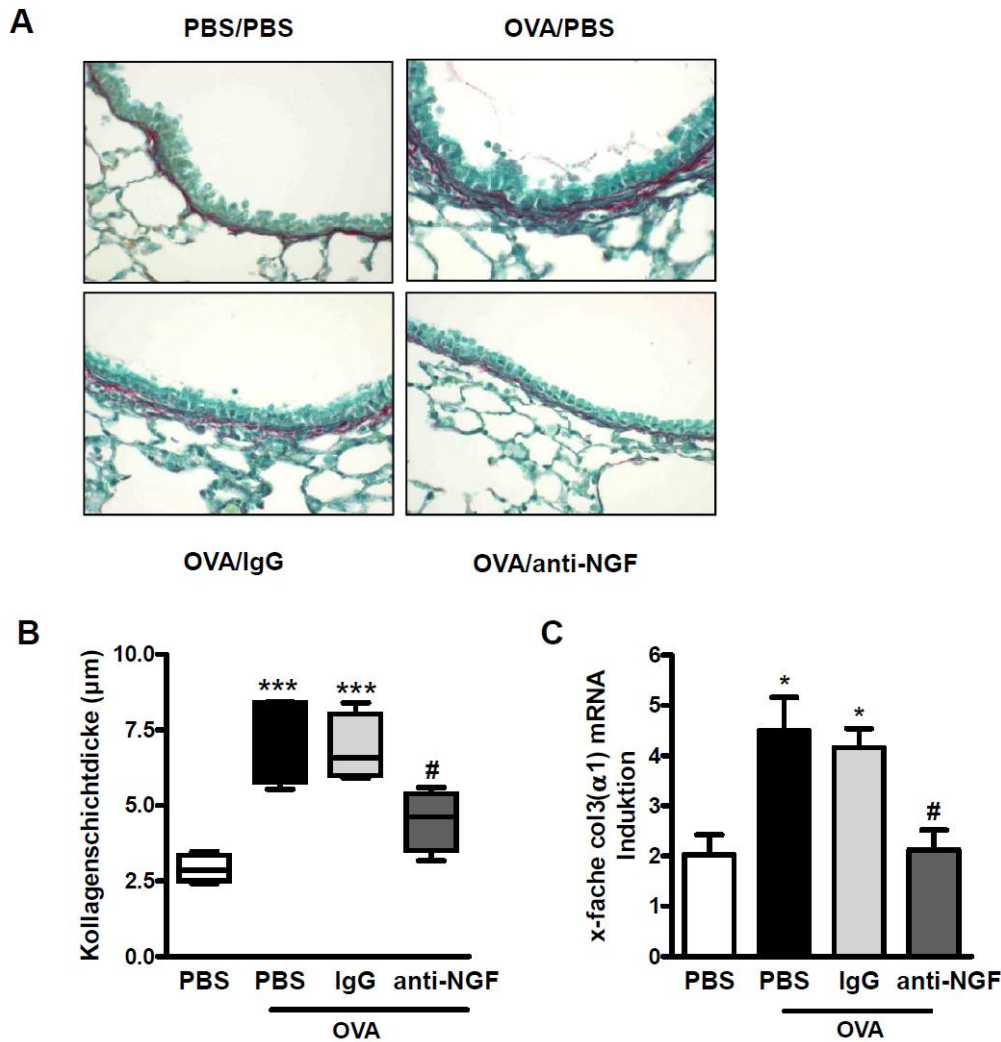


Abb.8 Die Neutralisierung von NGF im Modell der chronischen Atemwegsentzündung verhindert die Ausbildung einer peribronchialen Fibrose.

(A) Repräsentative Sirius Rot- Färbungen (x400) in Lungenschnitten der Versuchsgruppen aus 3.3.1 (B) Die Kollagenschichtdicke wurde in Sirius Rot gefärbten SURS der Lungen mittels Mikroskopsoftware bestimmt und graphisch als das 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentil dargestellt. Die quantitative Bestimmung der relativen col3(α1) mRNA- Expression im Lungengewebe erfolgte mittels RT-PCR normalisiert auf das *housekeeping* Gens L32 (C). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4-5 Tieren pro Gruppe. *p<0.05 und ***p<0.01 signifikant gegenüber PBS/PBS, #p<0.05 signifikant gegenüber OVA/PBS und OVA/IgG.

Die Quantifizierung unterstützte den histologischen Befund. Nach Allergenprovokation und chronischer Entzündung in den Atemwegen, ließ sich eine starke Verdickung der subepithelialen Kollagenschicht messen, welche von $2,90 \pm 0,39 \mu\text{m}$ in PBS/PBS-

Tieren auf $7,18 \pm 1,22 \mu\text{m}$ in OVA/PBS- Tieren zunahm. Auch in der OVA/IgG Gruppe war die Kollagenschicht mit $6,87 \pm 0,96 \mu\text{m}$ gegenüber der PBS/PBS Gruppe hochsignifikant verdickt. Diese starke Zunahme an subepitheliale Kollagen konnte durch die präventive Gabe von anti-NGF um ca. 40 % gegenüber der OVA/PBS- und OVA/IgG Gruppe signifikant verhindert werden und maß in der OVA/anti-NGF Gruppe $4,51 \pm 0,87 \mu\text{m}$ (Abb. 8B).

Um zu untersuchen, ob durch die anti- NGF Gabe die Expression der col3(α 1)- Kette reduziert war, wurde die mRNA- Expression in der Gesamtlunge mittels RT-PCR bestimmt (2.18.2 und 2.18.3)

Auch hier zeigte sich, dass in der chronisch allergischen Entzündungsreaktion (OVA/PBS und OVA/IgG) die Expression der col3(α 1)- Kette im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/PBS auf das Doppelte erhöht war. Die anti-NGF Gruppe wies eine zur OVA/PBS- Gruppe signifikant reduzierte Expression der col3(α 1)-Kette auf und lag auf dem Expressionsniveau der PBS/PBS- Kontrollgruppe (Abb. 8C).

Hieraus wurde geschlossen, dass durch die systemische anti-NGF Gabe die Ausbildung der retikulären BM im subepithelialen Bereich deutlich unterdrückt wurde.

3.3.3 Die chronische Atemwegsentzündung wird durch systemische anti-NGF- Gabe unterdrückt

Die Fibrosierung des Lungengewebes wird durch wiederholte Entzündung nach Allergenkontakt ausgelöst. Um zu untersuchen, ob durch die systemische AK-Gabe die lokale Entzündung beeinträchtigt wurde, wurden die BAL und das Gewebe untersucht. Die BAL wurde zur Gesamtzellzahlbestimmung (2.13.2.2) und der Anfertigung von Zytospins (2.13.2.3), die die differentielle Zellbestimmung ermöglichen, eingesetzt.

Die Analyse der Atemwegsentzündung in der BAL zeigte, dass durch die Immunisierung und anschließende Allergenprovokation ein starker Einstrom von Leukozyten in die Atemwege induziert wurde (OVA/PBS). So stieg die Leukozyten-Zahl von $1,41 \pm 0,44 \times 10^5$ Zellen /ml in PBS/PBS Tieren auf $5,53 \pm 3,07 \times 10^5$ Zellen /ml in OVA/PBS Tieren signifikant an. Die Applikation des nicht-spezifischen Isotyp- IgG vor der Provokation (OVA/IgG) führte zu keiner Minderung des Leukozyteneinstroms, so dass in diesen Tieren die gemessene Anzahl bei $6,72 \pm 2,29 \times 10^5$ Zellen/ml ebenfalls signifikant zur PBS/PBS-Kontrollgruppe erhöht war. In der mit anti-NGF (OVA/anti-NGF) behandelten Gruppe war im Gegensatz hierzu die Leukozytenzahl signifikant erniedrigt, so dass in der Lavage dieser Tiere durchschnittlich $2,87 \pm 0,71 \times 10^5$ Zellen/ml gezählt werden konnten. Die Analyse der Zytospins ergab, dass im Vergleich zur OVA/PBS-Gruppe, durch die anti-NGF- Gabe, vor allem die Anzahl der

eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten reduziert waren. Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten lag in der mit anti-NGF behandelten Gruppe bei $1,12 \pm 0,24 \times 10^5$ Zellen/ml und war damit im Vergleich zur OVA/PBS Gruppe mit $2,87 \pm 1,93 \times 10^5$ Zellen/ml signifikant reduziert. In der OVA/IgG- Gruppe war die Anzahl der Eosinophilen im Vergleich zur OVA/PBS- Gruppe leicht, aber nicht signifikant, erhöht und lag bei $3,99 \pm 1,6 \times 10^5$ Zellen/ml. In der PBS/PBS Gruppe waren keine Eosinophilen detektierbar. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die gezählten Lymphozyten in der BAL. Während die Allergenprovokation einen signifikant erhöhten Einstrom von Lymphozyten in die Atemwege verursachte, so dass ihre Zahl von nicht detektierbar in der PBS/PBS- Gruppe auf $3,02 \pm 1,9 \times 10^4$ Zellen/ml in der OVA/PBS- Gruppe anstieg, war, durch die präventive anti-NGF- Gabe, eine signifikante Reduktion der Lymphozyten auf $1,52 \pm 0,8 \times 10^4$ Zellen/ml zu beobachten. Die IgG-Gabe führte auch bei diesem Zelltyp zu einem leichten Anstieg der Zellzahlen auf $4,27 \pm 2,1 \times 10^4$ Zellen/ml, der sich aber nicht signifikant von der OVA/PBS-Gruppe unterschied.

Die Anzahl der Makrophagen war hingegen in keiner der Versuchsgruppen eindeutig verändert, so dass in der PBS/PBS- Gruppe $1,23 \pm 0,67 \times 10^5$ Zellen/ml, in der OVA/PBS- Gruppe $1,64 \pm 0,74 \times 10^5$ Zellen/ml, in der OVA/IgG- Gruppe $1,33 \pm 0,46 \times 10^5$ Zellen/ml und in der OVA/anti-NGF- Gruppe $1,13 \pm 0,59 \times 10^5$ Zellen/ml gezählt wurden. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten war ebenfalls durch die anti-NGF Gabe reduziert (PBS/PBS: nicht detektierbar; OVA/PBS: $4,0 \pm 1,6 \times 10^4$ Zellen/ml; OVA/IgG: $5,0 \pm 3,0 \times 10^4$ Zellen/ml; OVA/anti-NGF: $1,0 \pm 0,4 \times 10^4$ Zellen/ml (Abb. 9A).

Die chronische Atemwegsentzündung ist auch durch die Entzündung im Gewebe charakterisiert. Um den Effekt der anti-NGF-Applikation auf die Gewebsentzündung zu untersuchen, wurden HE-Färbungen (2.14.1) der Lungenschnitte angefertigt.

Die lichtmikroskopische Betrachtung dieser Lungen zeigte deutlich, dass im Vergleich zur PBS/PBS-Gruppe die Immunisierung und anschließende Provokation mit dem Allergen eine starke Infiltration des Gewebes mit Entzündungszellen (OVA/PBS) auslöste. Die OVA/IgG- Gruppe wies ein ähnliches Bild auf. Diese Infiltration wurde durch die regelmäßige Applikation eines neutralisierenden anti-NGF- AK (OVA/anti-NGF) fast vollständig verhindert (Abb. 9B).

Hieraus ließ sich schließen, dass die Gabe von anti-NGF zwar die Produktion Allergenspezifischer AK in diesem Modell nicht reduzierte, aber dafür neben der Atemwegsentzündung die subepitheliale Kollagenablagerung verhinderte.

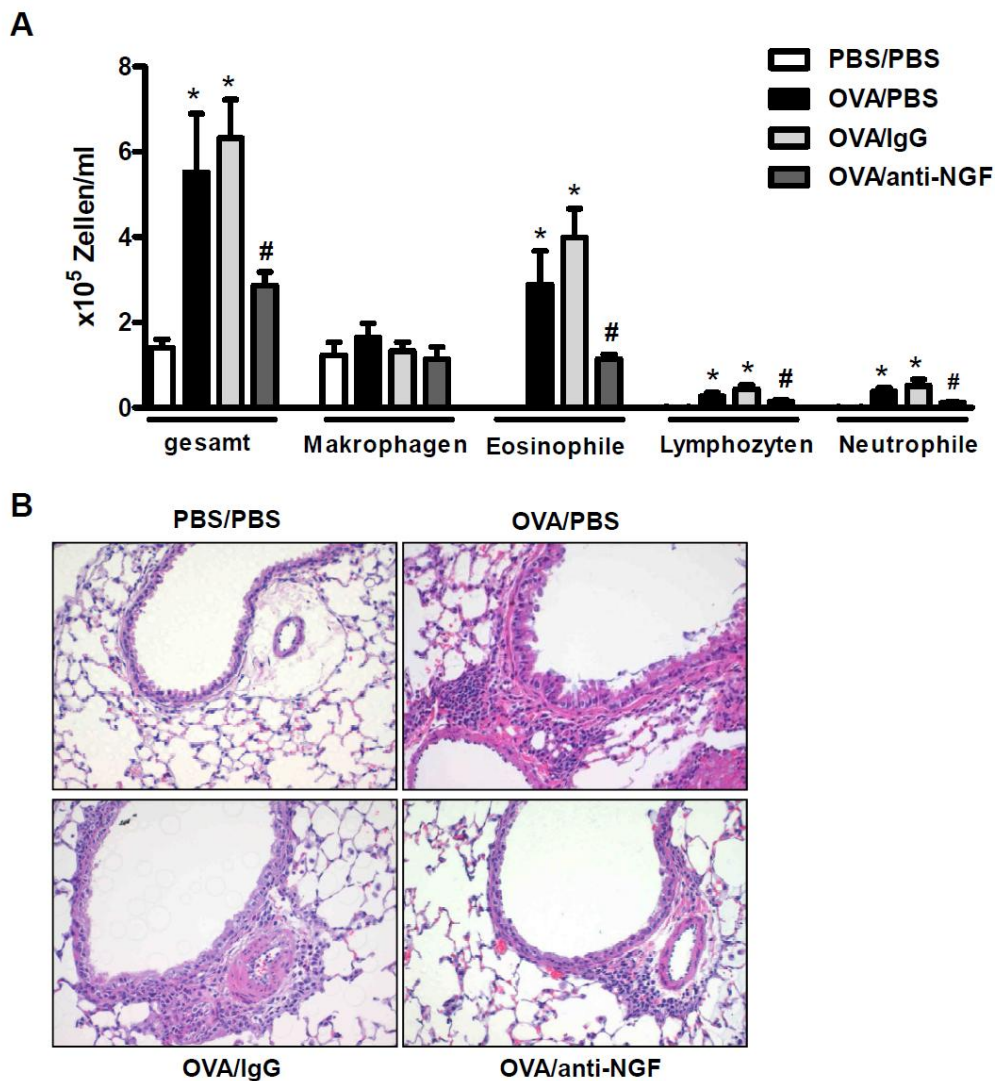


Abb.9 Die systemische anti-NGF Gabe supprimiert die chronisch allergische Atemwegsentzündung.

(A) Die Gesamtzellzahlen sowie die einzelnen Leukozyten-Populationen wurden in der BAL der Versuchsgruppen aus 3.3.1 bestimmt. (B) Repräsentative HE-Färbungen (x200) in Lungenschnitten der Versuchsgruppen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=5 pro Gruppe. * $p < 0.05$ gegenüber PBS/PBS, # $p < 0.05$ gegenüber OVA/PBS und OVA/IgG.

3.4 Auswirkung einer konstitutiven NGF-Expression in der Lunge *in vivo*

Strukturelle Veränderungen in den Atemwegen werden als Resultat wiederholter Entzündungs- und Reparaturzyklen angesehen. Der initiale Stimulus geht hierbei von der Entzündung aus, welche nach Gewebeschädigung die Wiederherstellung des Gewebeverbandes induziert. Durch die Entzündung werden Zellen geschädigt und setzen lokal Wachstumsfaktoren frei, die den Wundheilungsprozess und damit verbunden die Bildung und Ablagerung von retikulärem BG induzieren. NGF stellt

einen solchen Wachstumsfaktor dar. In der naiven Lunge auf sehr niedrigem Niveau exprimiert, wird in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung NGF signifikant erhöht freigesetzt (Abb.5B). Hieraus wurde geschlossen, dass die NGF- Sekretion von der lokalen Entzündung abhängig ist. Im vorherigen Versuch konnte zwar durch systemische Gabe von anti-NGF die verminderte Ablagerung von Kollagenen beobachtet werden, dies war aber gleichzeitig von einer signifikant abgeschwächten Atemwegsentzündung begleitet. Der anti-NGF Effekt könnte entweder indirekt, durch Beeinflussung der lokalen Entzündungsreaktion, oder direkt, durch die reduzierte Wirkung von NGF auf Fibroblasten, vermittelt worden sein. Um zu untersuchen, ob lokal erhöhte NGF- Spiegel in Abwesenheit eines Gewebeschadens zur Fibrosierung des Lungengewebes führen können, wurden CCSP- NGF-Tg Mäuse (2.11.1) untersucht.

3.4.1 Verstärkte Kollagenablagerung in den Atemwegen durch lokale NGF-Überexpression

Der CCSP-Promotor wird bereits vor Geburt aktiv, so dass bis zum Analysezeitpunkt der Mäuse, NGF über einen Zeitraum von mindestens 6 Wochen in erhöhten Mengen vorlag. Zur Untersuchung der durch NGF- vermittelten *remodeling* Prozesse wurden die Lungen naiver WT - und NGF-Tg Mäuse, mit je sechs Tieren pro Gruppe, lavagiert (2.13.2.1), für die Histologie aufbereitet (2.12.4.2) und für die Bestimmung der NGF-Konzentrationen im Gewebe homogenisiert (2.17.1.2).

Die Lavage wurde verwendet um im zellfreien Überstand die NGF-Konzentrationen mittels ELISA zu bestimmen. Hierbei zeigte sich, dass die konstitutive Expression in NGF-Tg- Mäusen dazu führte, dass entgegen der sehr niedrigen NGF-Spiegel in der WT- Maus von $8,70 \pm 1,01$ pg/ml diese in transgenen Mäusen $3370,89 \pm 867,11$ pg/ml maßen (Abb. 10A).

Neben der BAL- Flüssigkeit wurde zusätzlich das lavagierte Gewebe auf das Vorhandensein von erhöhten NGF- Mengen untersucht. Die gemessenen NGF- Werte wurden auf die Proteinmenge/mg Lungengewebe normalisiert.

Hierbei zeigte sich, dass die NGF- Spiegel in der Lunge von NGF-Tg Mäusen mit $170,97 \pm 59,41$ pg/mg im Vergleich zu WT- Mäusen mit durchschnittlich $0,47 \pm 0,25$ pg/mg signifikant erhöht vorlagen (Abb. 10B).

Für NGF sind immunmodulatorische Eigenschaften beschrieben. Es wirkt als Reifungs- und Überlebenssignal für unterschiedliche Leukozytenpopulationen. Es sollte daher als nächstes untersucht werden, ob durch die konstitutive NGF- Expression eine Infiltration des Gewebes durch mononukleäre Immunzellen vorlag. Hierfür wurde in der oben beschriebenen BAL die Zellzahl bestimmt.

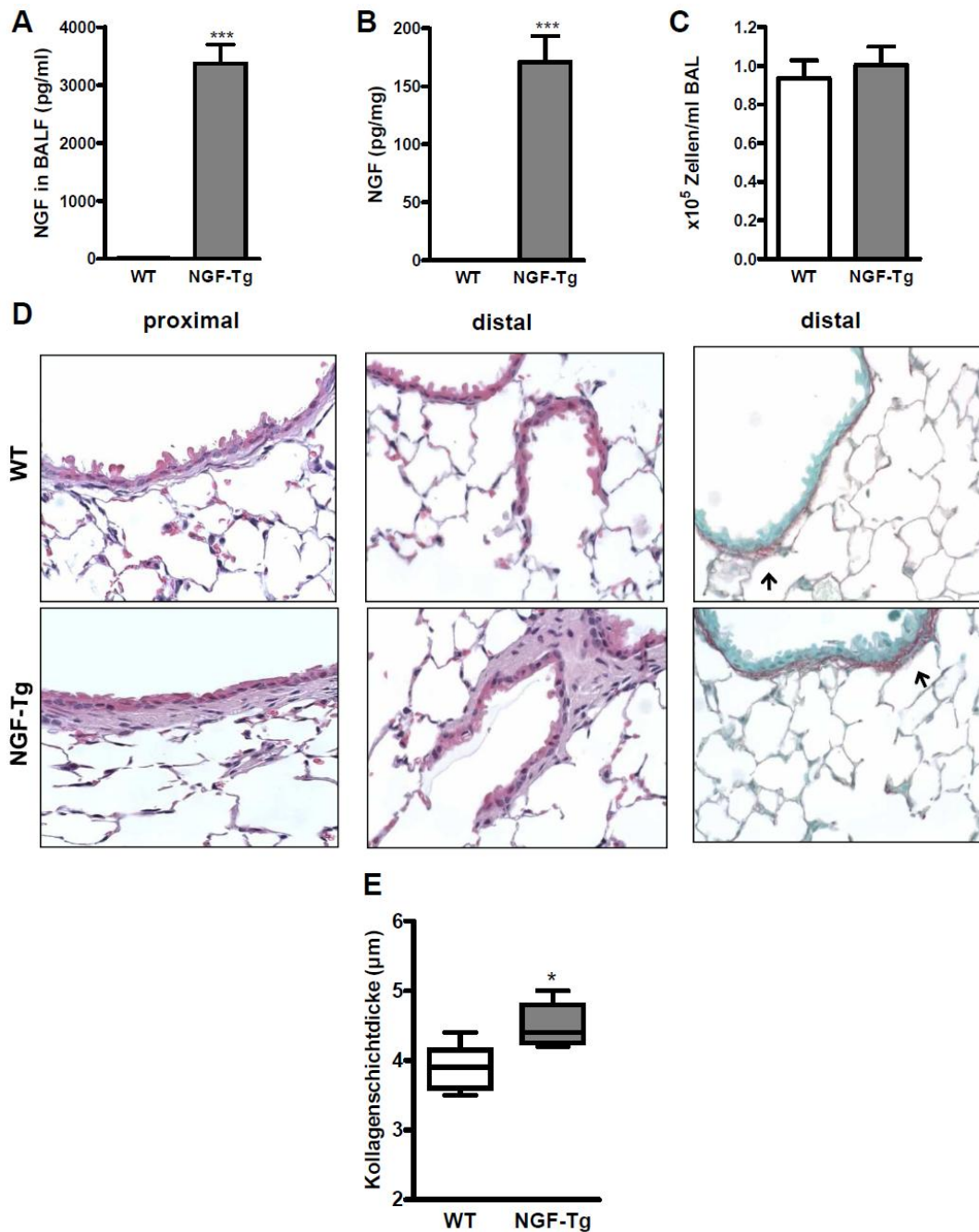


Abb.10 Die lokale Überexpression von NGF führt zur verstärkten Kollagenablagerung in Unabhängigkeit einer Entzündung.

(A) Die NGF- Konzentrationen wurden in naiven WT- und NGF-Tg Mäusen in der zellfreien BAL und dem Lungengewebe (B) mittels ELISA bestimmt. (C) In der BAL wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=5-6$ Tieren pro Gruppe. (D) Repräsentative histologische Färbungen mit HE (x200) und Sirius Rot (x200) proximaler und distaler Atemwege von WT- und NGF-Tg- Mäusen. (E) Die Kollagenschichtdicke wurde in SURS der Lungenschnitte mittels *computer assisted stereological toolbox-* (CAST) System bestimmt und graphisch als das 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentil dargestellt. Pfeile deuten auf das rote Kollagenband. * $p<0.05$ und *** $p<0.001$ gegenüber WT.

Die Auswertung ergab, dass die Zellzahl sich in beiden Gruppen nicht unterschied. In der WT- Gruppe konnten $0,94 \pm 0,25 \times 10^5$ Zellen/ml und in NGF-Tg- Mäusen $1,00 \pm 0,23 \times 10^5$ Zellen/ml gezählt werden (Abb. 10C).

Die nachfolgend geschilderte Untersuchung wurde in Kooperation mit der AG Prof. Heinz Fehrenbach durchgeführt. Um einen Überblick über die Atemwegsstruktur nach NGF- Überexpression zu erhalten, wurden Lungenschnitte zur Übersicht mit HE- und zur Detektion der subepithelialen Kollagenschicht mit Sirius Rot gefärbt.

In der HE- Färbung zeigte sich, dass die Atemwegswand NGF-Tg Mäuse sowohl im proximalen als auch im distalen Kompartiment im Vergleich zu WT- Mäusen verdickt war. Die Betrachtung der Kollagenfärbung zeigte, dass das Kollagenband um die Atemwege der NGF-Tg- Mäuse dicker erschien (Abb. 10D). Dieses wurde im Anschluss morphometrisch quantifiziert. Hierfür wurde die quantitative Bestimmung der Kollagenschichtdicke an SURS mittels *Computer Assisted Stereological Toolbox* (CAST) -Grid System durchgeführt. Dies beruht auf der randomisierten Auswahl der zu untersuchenden Gewebeareale durch die Software.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Kollagenschichtdicke in NGF-Tg -Mäusen mit durchschnittlich $4,50 \pm 0,28 \mu\text{m}$ im Vergleich zu WT -Mäusen mit $3,88 \pm 0,3 \mu\text{m}$ signifikant verdickt war (Abb. 10E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Präsenz erhöhter NGF- Spiegel in Unabhängigkeit einer lokalen Entzündung zu einer verstärkten Ablagerung von Kollagenen in subepithelialen Bereich führten.

3.4.2 Beeinträchtigung der Lungenphysiologie durch strukturelle Veränderungen in NGF-Tg Mäusen

Strukturelle Veränderungen in den Atemwegen werden vor allem mit einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion assoziiert. Die Verdickung der Atemwegswand in chronisch allergisch entzündeten Atemwegen verursacht die Verringerung des Atemweglumens und eine verstärkte Kollagenablagerung wird mit der Versteifung des Gewebes assoziiert. Um zu untersuchen, ob sich die verdickte Atemwegswand in NGF-Tg Mäusen auf die Lungenphysiologie auswirkte, wurde eine invasive Messung der Lungenfunktion durchgeführt. Bestimmt wurden die *baseline*- Werte, also der Atemwegswiderstand (R) und die Compliance (C) in nicht immunisierten und unprovozierten Mäusen mithilfe eines Kleintier- Kolbenhub- Respirators (2.11.4.1).

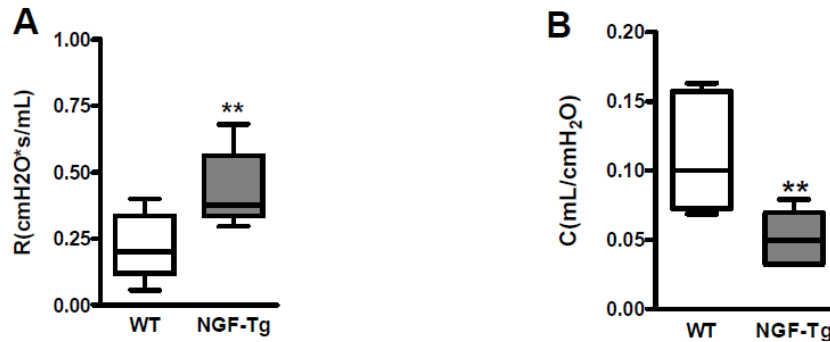


Abb.11 NGF-Tg Mäuse weisen eine veränderte Lungenphysiologie auf.

Mittels invasiver Lungenfunktionsmessung wurden der Atemwegswiderstand R (*resistance*) (A) und die *compliance* C der Lunge (B) in naiven WT- und NGF-Tg- Mäusen bestimmt und graphisch als das 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentil von n=6 Tieren pro Gruppe dargestellt. **p<0.01 gegenüber WT.

Es zeigte sich, dass der Atemwegswiderstand in NGF-Tg Mäusen mit durchschnittlich $0,43 \pm 0,13$ cmH₂O*s/mL im Vergleich zu WT- Mäusen mit $0,22 \pm 0,11$ mH₂O*s/mL erhöht war (Abb. 11A). Die Analyse der Compliance der Atemwege zeigte, dass diese in NGF-Tg Mäusen mit $0,05 \pm 0,02$ mL/cmH₂O im Vergleich zu WT-Mäusen mit durchschnittlich $0,11 \pm 0,04$ mL/cmH₂O deutlich erniedrigt war (Abb. 11B).

Aus diesen Daten ließ sich schließen, dass die veränderte Lungenmorphologie, welche durch erhöhte NGF-Spiegel verursacht wurde, sich in Unabhängigkeit einer Entzündung auf die Physiologie der Lunge negativ auswirkte.

3.5 Auswirkung der konstitutiven NGF-Expression auf die Fibrosierung in chronisch entzündeten Atemwegen *in vivo*

3.5.1 Die konstitutive NGF-Expression führt zu keiner Steigerung der Kollagenablagerung in chronisch entzündeten Atemwegen

Im vorherigen Versuch konnte die verstärkte Kollagenablagerung in Atemwegen NGF-Tg Mäuse gezeigt werden. Diese entwickelte sich unabhängig einer lokalen Entzündung. Im Folgenden wurde die Auswirkung der konstitutiven NGF Expression auf die Kollagenablagerung in der chronischen Entzündung untersucht. Hierzu wurden NGF-Tg Mäuse dem Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung (2.11.2) unterzogen und 24 h nach finaler Allergenprovokation wurden die BAL (2.13.2.1; 2.13.2.2; 2.13.2.3) sowie das Lungengewebe histologisch (2.13.3; 2.14.3) untersucht.

Es war zu beobachten, dass sich in NGF-Tg Mäusen eine chronisch allergische Atemwegsentzündung ausbildete, welche charakteristisch durch eine starke Infiltration der Atemwege mit Leukozyten gekennzeichnet war. Die Gesamtzellzahlen stiegen von $0,71 \pm 0,14 \times 10^5$ Zellen/ml in naiven Tieren auf $2,85 \pm 0,54 \times 10^5$ Zellen/ml in OVA-Mäusen an. Während die Anzahl der Makrophagen sich nicht signifikant veränderte (PBS: $0,71 \pm 0,14 \times 10^5$ Zellen/ml; OVA: $0,45 \pm 0,12 \times 10^5$ Zellen/ml), war ein deutlicher Einstrom eosinophiler Granulozyten mit $1,5 \pm 0,48 \times 10^5$ Zellen/ml in OVA behandelten Mäusen zu detektieren.

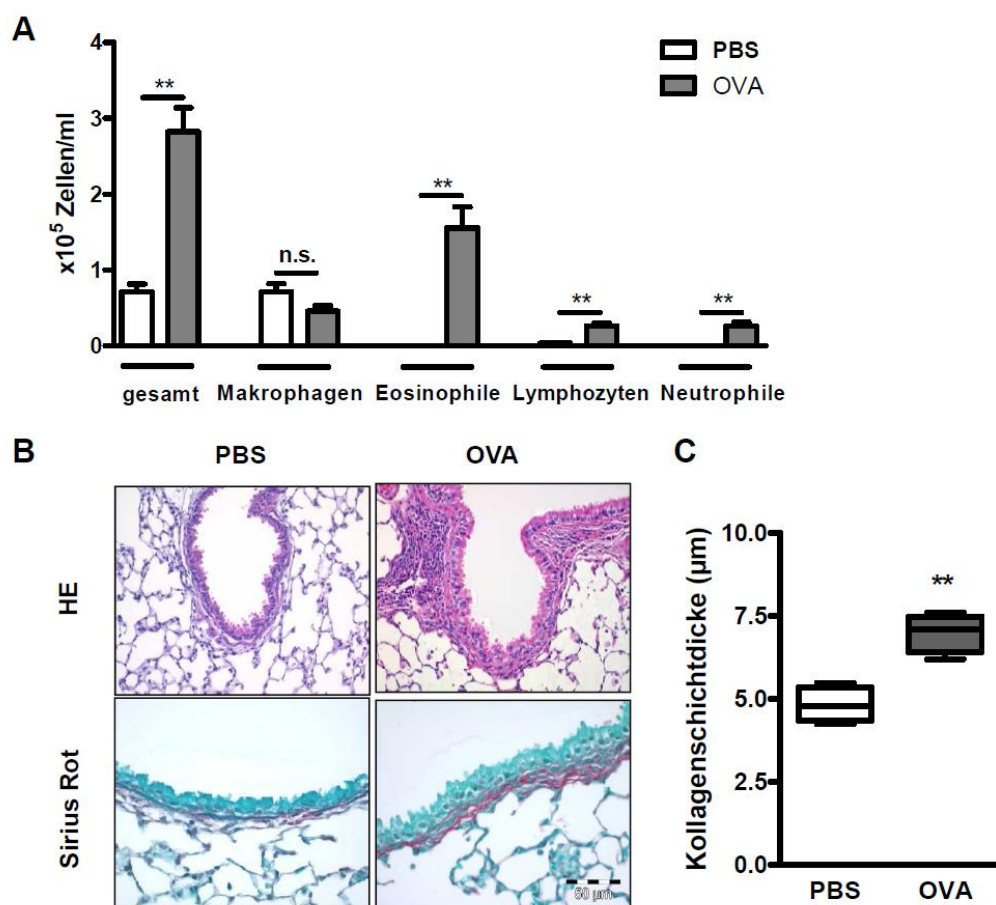


Abb.12 Die chronisch allergische Atemwegsentzündung führt zu keiner weiteren Steigerung der Kollagenablagerung in NGF-Tg Mäusen.

In NGF-Tg Mäusen wurde eine chronische Atemwegsentzündung induziert. (A) Die Gesamtzellzahlen sowie die einzelnen Leukozytenpopulationen wurden bestimmt und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=5$ Tieren pro Gruppe gezeigt. (B) Repräsentative HE- ($\times 200$) und Sirius Rot- ($\times 400$) Färbungen in Lungenschnitten. (C) Die mikroskopische Quantifizierung an SIRS ist graphisch als das 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentil von $n=4$ Mäusen pro Gruppe dargestellt. n.s.= nicht signifikant ; ** $p<0,01$ gegenüber PBS

Auch die Lymphozytenzahl erhöhte sich von $0,33 \pm 0,03 \times 10^4$ Zellen/ml in PBS- auf $2,6 \pm 0,7 \times 10^4$ Zellen/ml in OVA Mäusen. Auch die in naiven Mäusen nicht vorhanden neutrophilen Granulozyten waren in OVA-Mäusen erhöht nachzuweisen. Ihre Anzahl stieg auf $2,7 \pm 0,8 \times 10^4$ Zellen/ml an (Abb. 12A). Diese Atemwegsentzündung spiegelte sich im Gewebe wider. In OVA behandelten Mäusen war ein deutliches peribronchiales Infiltrat zu erkennen, welches in naiven Mäusen fehlte (Abb. 12B HE). Die Betrachtung der Kollagenablagerung in den Lungenschnitten verdeutlichte, dass sich diese strukturelle Veränderungen im Gewebe nach chronischer Allergenprovokation in den Mäusen ausbildete (Abb. 12B Sirius Rot). Das subepitheliale Kollagenband wurde mikroskopisch an SURS quantifiziert und ergab eine deutliche Verdickung der Kollagenablagerung in OVA- Mäusen. Diese nahm von $4,83 \pm 0,46 \mu\text{m}$ in Kontroll-Mäusen auf $7,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ signifikant zu (Abb. 12C), unterschied sich allerdings nicht von WT-OVA-Mäusen (Abb.8). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verstärkte Kollagenablagerung in chronisch allergisch entzündeten Atemwegen durch die transgene NGF- Expression nicht weiter gesteigert werden konnte.

3.6 Rolle des NGF-Rezeptors $p75^{\text{NTR}}$ bei der NGF- induzierten Kollagenexpression

Intrazelluläre Signalwege, die für die Induktion der Kollagensynthese beschrieben wurden, beinhalten neben den durch $\text{TGF}\beta 1$ aktivierten SMAD-Proteinen auch die Stress aktivierten MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 (Hayashida et al., 2003; Alcorn et al., 2009; Rodriguez-Barbero et al., 2002). NGF, als Neurotrophin, vermittelt seine Effekte über zwei strukturell unterschiedliche und nicht-verwandte Rezeptorsysteme. Beide Rezeptoren aktivieren ihrerseits unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden. Während für die Aktivierung von TrkA die Signalgebung über die MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 beschrieben ist, führt die Aktivierung des $p75^{\text{NTR}}$ zur Aktivierung der JNK. Da für $p75^{\text{NTR}}$ die Aktivierung eines relevanten Signalwegs beschrieben wurde, sollte zunächst dessen Einfluss auf die Kollagen- Expression untersucht werden.

3.6.1 Knock- out des $p75^{\text{NTR}}$ beeinträchtigt nicht die NGF- induzierte Kollagen III- Expression *in vitro*

Für diese Untersuchung wurden MLF aus WT- und $p75^{\text{NTR}/-}$ -Mäusen isoliert und untersucht. Hierfür wurden MLF aus WT- und $p75^{\text{NTR}/-}$ Mäusen wie, unter 2.16.1.3

beschrieben kultiviert. Nach Synchronisierung der Zellen, erfolgte die Stimulation mit NGF (100ng/ml) über einen Zeitraum von 8 h. Anschließend wurde die relative col3(α 1)- mRNA Expression mittels RT-PCR bestimmt. Als Kontrollen wurden für beide Zelltypen jeweils unstimulierte Zellen (control) mitgeführt.

Hier zeigte sich, dass nach NGF- Stimulus die relative col3(α 1) mRNA- Expression für WT- und p75^{NTR/-}- MLF im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht war. Vergleich man die mit NGF stimulierten Gruppen miteinander, wurde deutlich, dass die col3(α 1)- mRNA Expression in p75^{NTR/-}- MLF sich nicht signifikant von der in WT- MLF unterschied.

Hieraus ließ sich schließen, dass NGF für die *in vitro* induzierte col3(α 1)-Expression die funktionelle Expression des p75^{NTR}- Rezeptor nicht benötigt.

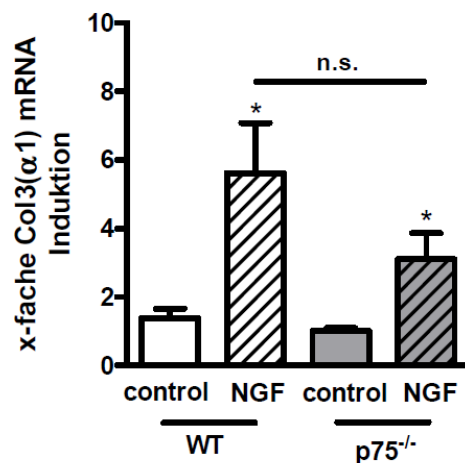


Abb.13 NGF aktiviert den Rezeptor p75^{NTR} nicht zur col3(α 1)-mRNA Expression *in vitro*.

Primäre MLF wurden aus der Lunge von WT- und p75^{-/-}- Mäusen isoliert und mit NGF stimuliert. Die relative col3(α 1)-mRNA Expression wurde mittels RT-PCR quantifiziert und auf das *housekeeping*-Gen L32 normalisiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=5 Bestimmungen pro Gruppe. n.s.=nicht signifikant; *p<0.05 gegenüber jeweiliger control.

3.6.2 Rolle des NGF- Rezeptors p75^{NTR} bei der subepithelialen Kollagenablagerung *in vivo*

Um die Beteiligung dieses Rezeptorsystems an der subepithelialen Fibrose *in vivo* untersuchen zu können, wurden NGF-Tg -Mäuse, welche sowohl den NGF Rezeptor TrkA als auch p75^{NTR} exprimieren mit p75^{NTR/-}- Mäusen gekreuzt. Für die folgende Analyse wurden NGF-Tg/p75^{NTR+/+}, NGF-Tg/p75^{NTR+/-}, NGF-Tg/p75^{NTR-/-} generiert und ihre Lungenmorphologie wurde mit NGF-WT/p75^{NTR-/-} und NGF-WT/p75^{NTR+/+}

histologisch verglichen. Hierzu wurden für jede Gruppe zur Übersicht HE- Färbungen (2.14.1) und für den Kollagennachweis Sirius Rot- Färbungen (2.14.3) der Lungenschnitte angefertigt. Es wurden hierbei die Dicke der Atemwegswand und die subepitheliale Kollagenablagerung näher untersucht.

Es zeigte sich hierbei, dass der funktionelle *knock-out* des $p75^{\text{NTR}}$ - Gens *per se* (NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/-}$) verglichen mit WT- Mäusen, NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$, zu keiner strukturellen Veränderung in der Atemwegswand führte.

Im Vergleich hierzu wiesen NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/+}$ eine deutlich verdickte Atemwegswand auf. Wurden die $p75$ - Allele im NGF-Tg- Hintergrund einzeln deletiert, so zeigte sich, dass trotz des eingeführten *knock out* von $p75^{\text{NTR}}$ die Dicke der Atemwegswand in NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ und NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ im Vergleich zur NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/+}$ nicht verringert wurde. Die mikroskopische Analyse der subepithelialen Kollagenablagerung zeigte, dass der Unterschied zwischen NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/+}$ und NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$ durch die Deletion des $p75^{\text{NTR}}$ nicht verringert wurde, wobei kein phänotypischer Unterschied zwischen NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ und NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ zu beobachten war. Trotz des *knock outs*, war noch ein vergleichbar breites Kollagenband im NGF-Tg –Hintergrund im Vergleich zu NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$ nachzuweisen. NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/-}$ - Mäuse wiesen auch bei dieser Analyse keine Unterschied zu NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$ auf (Abb. 14A).

Der Mikroskopie wurde die Quantifizierung der Kollagenschichtdicke angeschlossen. Es wurde, wie bereits beschrieben, die Analyse für 4 Tiere pro Genotyp durchgeführt.

Die Quantifizierung spiegelte den histologischen Befund wider. So betrug die Kollagenschicht in NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/+}$ durchschnittlich $6,99 \pm 0,81 \mu\text{m}$ und war damit deutlich dicker als in NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$ mit $3,32 \pm 0,86 \mu\text{m}$. In NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ - Mäusen waren $5,67 \pm 0,89 \mu\text{m}$ und in NGF-Tg/ $p75^{\text{NTR}/-}$ - Mäusen $5,86 \pm 0,94 \mu\text{m}$ zu messen. Die in NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/-}$ -Mäusen gemessene Schicht mit $4,53 \pm 0,38 \mu\text{m}$ war zu der in NGF-WT/ $p75^{\text{NTR}/+}$ nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 14B).

Diese Ergebnisse legten nahe, dass auch in der *in vivo*- Situation NGF in Abwesenheit des $p75^{\text{NTR}}$ die subepitheliale Fibrose induzieren kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die NGF induzierte $\text{col3}(\alpha 1)$ - mRNA Expression in MLF und Kollagenablagerung in NGF-Tg Mäusen in Abwesenheit eines funktionellen $p75^{\text{NTR}}$ - Rezeptors vorlag. Somit wurde als möglicher intrazellulärer Signalweg die JNK- Aktivierung ausgeschlossen werden.

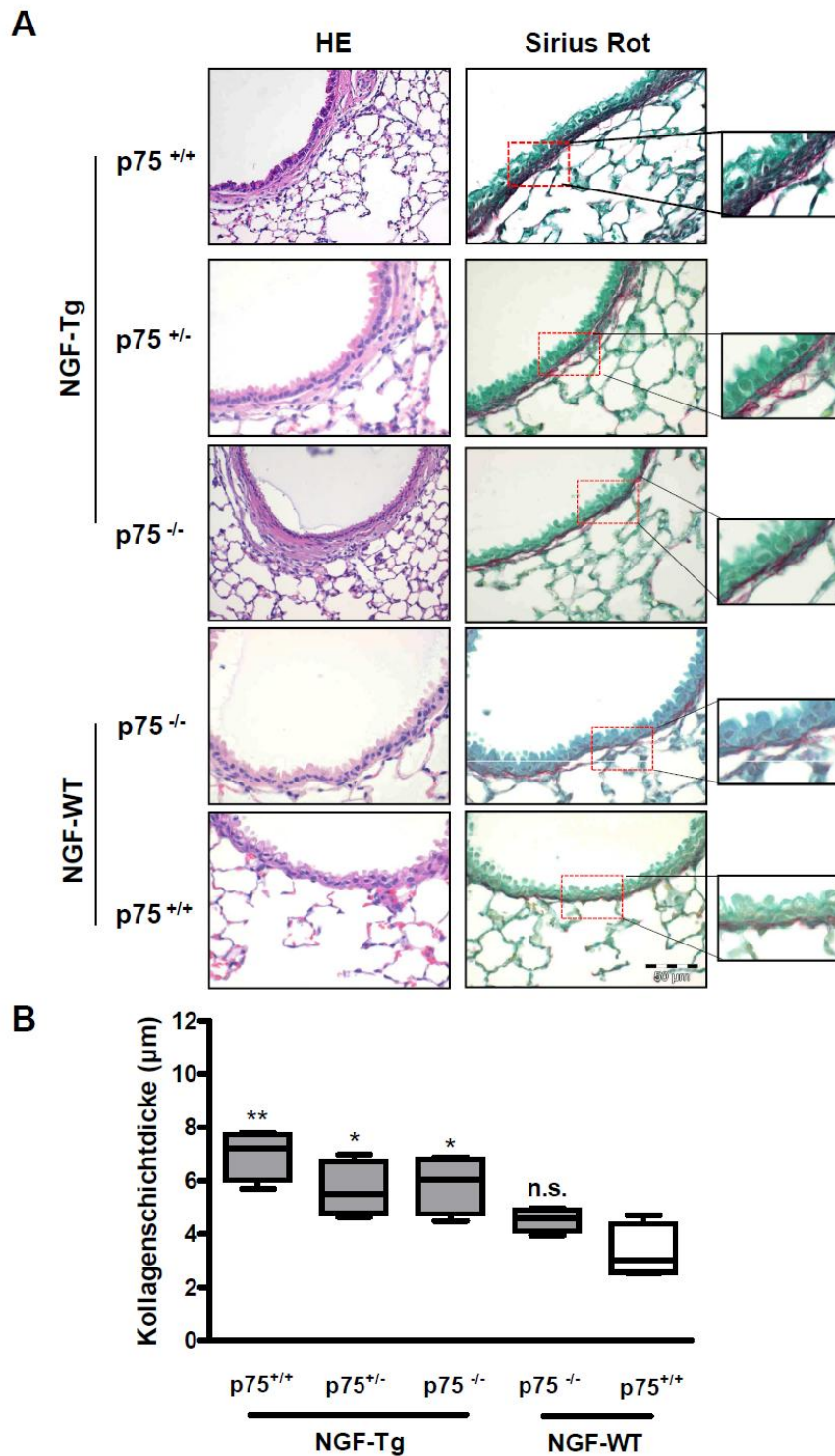


Abb.14 Die funktionelle Expression des NGF- Rezeptors p75^{NTR} ist an der verstärkten Kollagenablagerung in NGF-Tg Mäusen nicht beteiligt.

NGF-Tg Mäuse wurden mit p75^{NTR}^{-/-}-Mäusen gekreuzt und die einzelnen Genotypen (NGF-Tg/p75^{NTR}^{+/+}, NGF-Tg/p75^{NTR}^{+/-}, NGF-Tg/p75^{NTR}^{-/-}, NGF-WT/p75^{NTR}^{-/-} und NGF-WT/p75^{NTR}^{+/+}) wurden histologisch auf strukturelle Veränderungen und eine verstärkte Kollagenablagerung untersucht. (A) Gezeigt sind repräsentative HE- und Sirius Rot- Färbungen (beide x200) und Ausschnittsvergrößerung (x400) in Lungenschnitten der einzelnen Genotypen. (B) Graphische Darstellung der morphometrischen Quantifizierung der subepithelialen Kollagenschicht in SURS. In der Grafik dargestellt sind das 10., 25., 50. (Median), 75. und 90. Perzentil aus n=4 pro Gruppe. n.s.=nicht signifikant; *p<0.05, **p<0.01 gegenüber NGF-WT/p75^{NTR}^{+/+}.

3.7 Rolle des NGF-Rezeptors TrkA bei der Kollagenexpression

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten eine direkte Beteiligung von NGF an der Fibrosierung der Atemwege durch die direkte Kollageninduktion. Als mögliches Rezeptorsystem konnte zudem der p75^{NTR}-Rezeptor ausgeschlossen werden. Es blieb nun zu untersuchen, ob die Kollagensynthese durch NGF über den Rezeptor TrkA vermittelt wird.

3.7.1 TrkA-Signalwege aktivieren die Kollagen III Transkription *in vitro*

Mit einer Promotoranalyse des col(3 α 1)-Gens sollte untersucht werden, ob der bisher beobachtete Effekt der NGF induzierten col3(α 1)-mRNA Expression auf der direkten Transkriptionsaktivierung beruht. Für diese Untersuchung wurde von MLF abgewichen und HEK293 eingesetzt.

HEK293 exprimieren keinen NGF-Rezeptor TrkA, so dass für dieses Experiment die TrkA-Expression über eine transiente Transfektion mit TrkA-Expressionsplasmiden erfolgte. Die verwendeten TrkA-Plasmide wurden von Moses V. Chao (Skirball University, NY, USA) zur Verfügung gestellt. Es wurden die Plasmide pcDNA-ratTrkA als WT und als Mutante (K538R) eingesetzt. Die Mutation K538R liegt in der Tyrosinkinase-Domäne, wodurch eine Aktivierung des Rezeptors nicht erfolgen kann. Die Expression, nach transients Transfektion mit 0,5 μ g Rezeptorplasmiden (2.18.8) für 18 h, und Aktivierbarkeit, nach 30 minütiger Stimulation mit NGF (100ng/ml), der exprimierten Rezeptoren wurde mittels Immunpräzipitation (IP) (2.17.3) und Immunoblot (IB) (2.17.5) nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass beide Rezeptoren gleich effektiv exprimiert wurden (Abb. 15A; IB:TrkA im Vergleich zu β -actin) und nur der TrkA-WT eine Aktivität (phospho-Tyrosin; p-Tyr) zeigte. Außerdem war zu beobachten, dass der WT-Rezeptor *per se* die maximale Aktivität aufwies, da nach NGF-Stimulus kein stärkeres p-Tyr-Signal zu beobachten war. Im Gegensatz hierzu zeigte die Mutante (K538R) weder unter Kontroll-Bedingungen noch nach NGF-Stimulus eine Aktivierung (Abb. 15A).

Für die Untersuchung der col3(α 1)-Promotoraktivierung wurden Luziferase (Luc)-Promotor-Reporterkonstrukte, für unterschiedlich lange Bereiche des Promotors, generiert (2.18.5). Würde der Promotor durch TrkA nachgeschalteten Signalkaskaden aktiviert, würde anstelle der col3(α 1) RNA, die der Leuchtkäfer (*firefly*)-Luc transkribiert. Um die Unterschiede einer eventuell unterschiedlich effizienten Transfektion auszuschließen, wurde zur Kontrolle dieser, im gleichen Ansatz, das Reporterplasmid pSV40-RenillaLuc ko-transfiziert. Dieses Plasmid induziert unter der Kontrolle des im Plasmid vorhandenen SV40-Promotors die Bildung der *Renilla reniformis* spezifischen Luc (RenillaLuc). Beide Enzyme setzen bei der Spaltung ihres

Substrats Licht frei. Diese Lichtemission kann mittels Lumineszenzmessung bestimmt werden. Die Einheit der Lichtemission wird als *relative light unit* (RLU) angegeben. Die RLU, welche sich aus der Aktivität der firefly-Luc ergeben, werden auf die der RenillaLuc normalisiert und als relative Luziferase- Aktivität angegeben. Hierbei spiegelt die relative Aktivität die Menge an gebildeter col3(α 1) mRNA wider.

Es wurde genomische DNA aus Fibroblasten isoliert und unter Verwendung der in 2.5.2 gelisteten Primer wurden unterschiedlich lange Fragmente des col3(α 1)- Promotors amplifiziert (2.18.5.1), wobei das 5'- Ende entweder -1000 bp, -500 bp oder -120 bp vom Transkriptionsstartpunkt +1 entfernt lag. Der 3'- Bereich wurde für alle Fragmente gleich gewählt, so dass dieser bei +97 lag. Die generierten Fragmente wurden *pCol3a1-1000bp-luc*, *pCol3a1-500bp-luc* und *pCol3a1-120bp-luc* benannt.

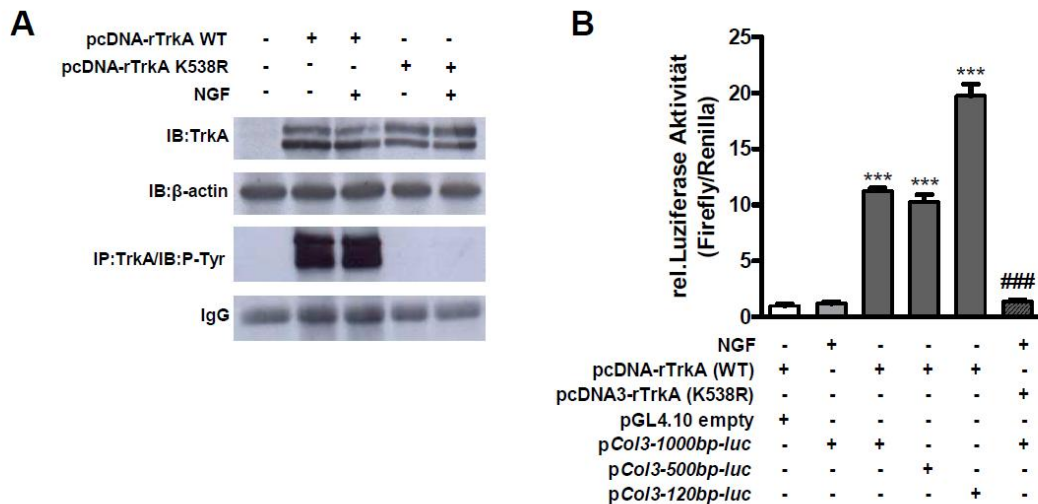


Abb.15 NGF aktiviert die col3(α 1)- Transkription über TrkA-Signalwege.

(A) Der NGF- Rezeptor TrkA wurde in HEK293- Zellen über Expressionsplasmide als TrkA (WT) und inaktive Mutante TrkA(K538R) exprimiert und auf die Funktionalität (p-Tyr=phospho Tyrosin) getestet. (B) Col3(α 1)- Promotor- Reporterkonstrukte für unterschiedlich lange Bereiche des Promotors wurden generiert und auf eine Aktivierung durch TrkA (WT) und TrkA(K538R) hin untersucht. Als Transfektionskontrolle diente das Reporterkonstrukt pSV40-RL. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM mit n=5. IP= Immunpräzipitation; IB= Immunoblot. ***p<0.001 gegenüber Kontrolle; ###p<0.001 gegenüber pCol3-1000 bp-luc.

Zur Untersuchung der Promotoraktivierung wurden HEK293 Zellen (2.16.2.2) bei Erreichen einer Konfluenz von 50 % mit TrkA- Expressionsplasmiden, wie zuvor beschrieben, transfiziert. Nach 18 h wurden die Zellen zunächst für 2 h ausgehungert und anschließend mit 1 μ g der entsprechenden Promotor- Reporterkonstrukte transfiziert (2.18.8). Als Transfektionskontrolle wurde, wie zuvor beschrieben, das pSV40- RenillaLuc Reporterplasmid ko- transfiziert. Nach zwei Stunden erfolgte die

Stimulation unter Serum freien Bedingungen um die Aktivierung durch im FCS enthaltenen Wachstumsfaktoren auszuschließen. Da TrkA (WT) nach Expression bereits die maximale Aktivität zeigte, wurden lediglich jene Ansätze, die nicht mit TrkA (WT) transfiziert wurden, mit NGF (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden nach 8 h Stimulation den Herstellerangaben des *Dual-Luciferase-Assay*[®] (Promega) folgend aufbereitet und mit einem Plattenreader wurde die Lumineszenz für die jeweiligen Luziferasen ermittelt (2.18.9).

Es zeigte sich, dass nach Transfektion des TrkA (WT)- Rezeptors und des Leervektors pGL4.10 ein sehr niedriges Signal gemessen wurde. Hierdurch konnte eine unspezifische Aktivierung des firefly-Luc Plasmids durch den aktiven Rezeptor ausgeschlossen werden. Wurden jedoch TrkA (WT) exprimierende Zellen anstelle des Leervektors mit den unterschiedlichen Promotor-Reporterkonstrukten transfiziert, zeigte sich eine deutliche Luziferase- Aktivität. Wurde der 1000 bp und 500 bp umspannende Bereich transfiziert, konnte eine ca. 9-fach höhere Luc- Aktivität gemessen werden. Wurde der kleinste Bereich mit 120 bp des col3(α 1)-Promotors transfiziert, war eine um das ca. 16-fach erhöhte Luc-Aktivität messbar. Erfolgte die Transfektion des pCol3a1-1000-luc Reporter in Zellen ohne TrkA (WT) Expression oder in Zellen, welche die TrkA (K538R) exprimierten, war im Vergleich hierzu nur eine geringe Luc-Aktivität messbar (Abb. 15B). Hieraus ließ sich schließen, dass die TrkA nachgeschalteten Signalwege Transkriptionsfaktoren aktivierten, die ihrerseits über die Bindung an den col3(α 1)- Promotor die Transkription aktivierten. Des Weiteren ließ sich vermuten, dass diese Bindestellen für diese Faktoren in dem Bereich kurz vor dem TK- Startpunkt +1 liegen, da im kürzesten Promotorfragment die stärkste Aktivierung zu beobachten war. Die Daten legen nahe, dass im Bereich von -1000 bp bis -120 bp des Promotors Faktoren binden können, welche die Transkription reprimieren.

Als nächstes sollte untersucht werden über welchen Signalweg NGF die col(3 α 1)- Transkription aktiviert. Signalwege, die für die Kollagenexpression beschrieben wurden, beinhalten vor allem die Stress- aktivierten MAP-Kinasen. Hierzu gehören neben dem JNK- Signalweges auch die p38 MAPK und die ERK1/2. Auf die Untersuchung JNK- Signalweg wurde verzichtet, da dieser durch den NGF-Rezeptor p75^{NTR} aktiviert wird.

Hierzu wurden HEK293 Zellen wie im vorherigen Experiment beschrieben ausgesät und mit TrkA (WT) transfiziert. Als Kontrolle wurden nicht- transfizierte Zellen mitgeführt. Nach 18 h wurden die Zellen für 2 h ausgehungert und anschließend, wiederum unter Serum freien Bedingungen, wurden Zellen nach 0, 1, 2, 5, 15, 30 und 60 min lysiert. Auf die NGF- Stimulation wurde verzichtet, da im vorherigen Experiment die maximale Aktivität des Rezeptors nach Überexpression zu beobachten war. Mittels

Immunoblot wurde die Aktivierung der p38 MAPK und ERK1/2 untersucht. In den Proben wurden phospho-p38 und Gesamt-p38 sowie phospho-ERK1/2 und Gesamt-ERK1/2 detektiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Expression des Rezeptors und damit dessen Aktivierung bereits detektierbare Level an aktivierter (phospho-) p38 und phospho- ERK1/2 aufwies. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Aktivierung beider Kinasen über den untersuchten Zeitraum von 60 min anhielt. Das Vorhandensein phosphorylierter Proteine war auf eine Aktivierung des Rezeptors TrkA zurückzuführen, da in der Negativkontrolle nach Aushungern keine phospho-Signale der untersuchten Kinasen detektierbar waren (Abb. 16A).

Um die Rolle beider Signalwege bei der $\text{col3}(\alpha 1)$ -Transkriptionsaktivierung zu untersuchen wurden kommerziell erhältliche reversible *small molecule* Inhibitoren eingesetzt. Diese sind membrangängig, binden ihr Zielprotein und verhindern dessen Aktivierung. Für p38 MAPK wurde das Agens SB202190 und für ERK1/2 U0126 mit einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt.

Die Effektivität der Inhibitoren wurde mittels Immunoblot nachgewiesen. In HEK293-Zellen wurde, wie oben beschrieben, der TrkA (WT) exprimiert. Es wurde in einem Ansatz das Solvent DMSO, im gleichen Volumenverhältnis wie der Inhibitor, und in einem weiteren Ansatz der jeweilige Inhibitor für 30 min prä- inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne TrkA Expression und als Positivkontrolle TrkA (WT) exprimierende Zellen ohne Vorbehandlung mitgeführt. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen für 15 min in Serum freien Medium inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, Gesamtprotein isoliert und über SDS-Page aufgetrennt und mittels Western blot wurden zum einen phospho- p38 und phospho-ERK1/2, sowie p38 und ERK1/2 detektiert.

Es zeigte sich, dass sich die durch TrkA Expression induzierte Aktivierung der Kinasen durch Einsatz der spezifischen Inhibitoren unterbinden ließ. Die Vorinkubation mit DMSO hatte hierbei keinen Einfluss auf die Aktivierung der Kinasen im Vergleich zu Zellen die keine Vorbehandlung erhielten. Die Negativkontrollen wiesen keine aktiven Signale auf (Abb. 16B).

Gängige Protokolle verwenden diese reversiblen Inhibitoren in einer Prä-Inkubationsphase für 30 min vor Stimulationsbeginn. In Vorexperimenten zeigte sich jedoch, dass eine solch kurze Zeit im Vergleich zu 8 h Versuchsdauer nicht ausreichte um die Aktivierung der Kinasen zu unterbinden. Im Vorfeld galt hierbei zu untersuchen, ob sich die Gabe dieser Inhibitoren, welche in DMSO gelöst waren, über 8 h auf die Vitalität der Zellen auswirkte. Als Nachweisverfahren wurde die Aktivitätsmessung mitochondrialer Dehydrogenasen, wie unter 2.19 beschrieben, gewählt. Vitale Zellen

wären in der Lage das zugefügte nicht farbige Substrat MTS umzusetzen und daraus Formazan zu bilden. Dieses kann photometrisch detektiert werden. Wäre die Vitalität der Zellen durch die Behandlung eingeschränkt, wäre eine geringere Bildung von Formazan und damit verbunden eine niedrigere Absorption zu erwarten.

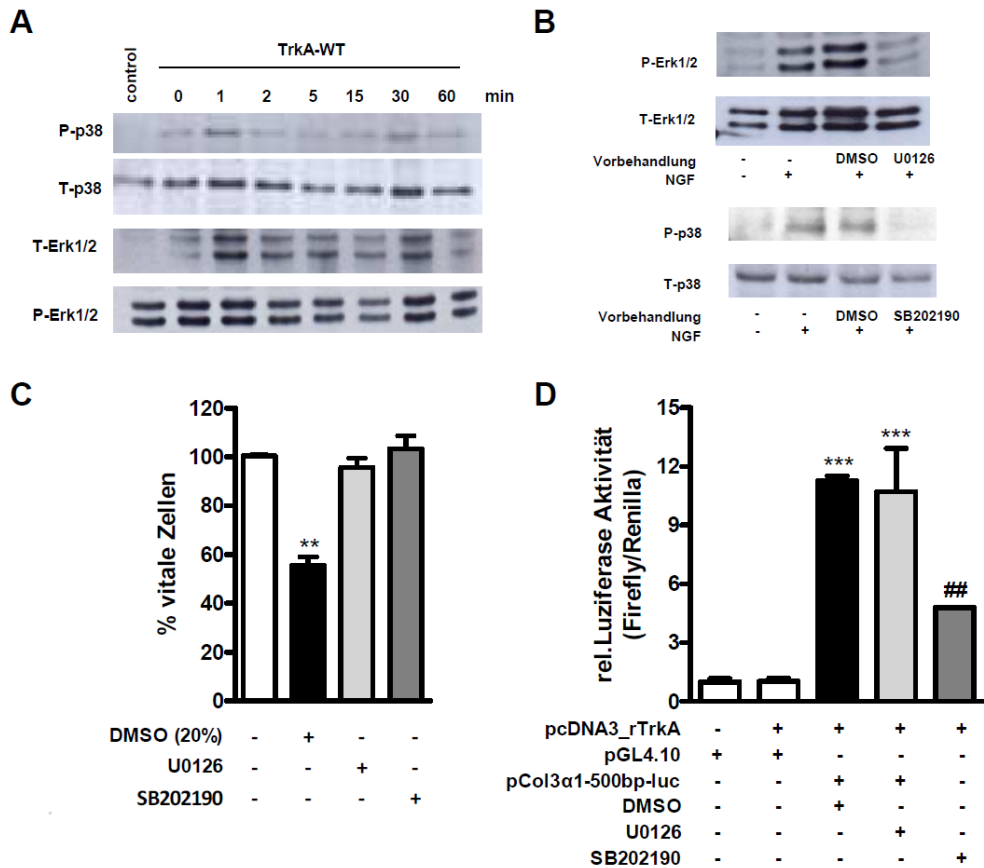


Abb.16 NGF aktiviert die col3(α1)- Transkription über die Aktivierung der p38 MAPK.

(A) Mittels Western blot wurden untransfizierte und TrkA (WT) exprimierende HEK293 auf aktive p38 MAPK (phosphorylierte-p38, P-p38) und ERK1/2 (P-ERK1/2) über einen Zeitraum von 1h untersucht. Die Inhibitoren U0126 für ERK1/2 und SB202190 für die p38 MAPK wurden auf ihre Effektivität (B) und Zytotoxizität (C) getestet. Die Aktivierung des pCol3α1-500 bp-Luc Reporterplasmids wurde in Zellen in Abwesenheit und Gegenwart der Inhibitoren nach 8 h bestimmt (D). Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=4-5 Bestimmungen pro Gruppe. T= total, P= phospho. **p<0.01 und ***p<0.001 gegenüber Negativkontrolle, ##p<0.01 gegenüber Positivkontrolle.

Es wurden HEK293 in 96-Flachboden Mikrotiterplatten ausgesät und, wie oben beschrieben, in diesen TrkA für 18 h exprimiert. Die Zellen wurden synchronisiert und die Inhibitoren mit einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Als Positivkontrolle, also vitale Zellen, wurden in Serum freien Medium kultivierte Zellen mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche über 8 h in 20 % DMSO (v/v) haltigem Medium

kultiviert wurden. Den Zellen wurde nach 30 min, gemäß den Herstellerangaben, die Substratlösung zugefügt. Die Absorptionsmessung wurde nach 8 h durchgeführt. Die Absorptionswerte der Positivkontrolle wurden gleich 100 % und die der weiteren Ansätze zu dieser in Relation gesetzt.

Die Aktivitätsmessung zeigte, dass die Inkubation mit hohen Mengen an DMSO zu einer Abnahme der Zellvitalität um ca. 50 % im Vergleich zur Positivkontrolle führte. Im Gegensatz hierzu bewirkten die verwendeten Inhibitoren keine Einschränkung der Zellvitalität. Somit war gewährleistet, dass eventuelle Unterschiede im Luc- Signal nicht auf eine beeinträchtigte Zellvitalität zurückzuführen waren (Abb. 16C).

Um zu untersuchen, welcher Signalweg für die Kollagenexpression von Bedeutung war, wurden HEK293, wie zuvor beschrieben, ausgesät und transfiziert. Als Negativkontrollen dienten Zellen ohne TrkA- Expression, die mit dem leeren Reportervektor transfiziert wurden, sowie Zellen die neben TrkA (WT) auch den leeren Reportervektor erhielten. In diesem Experiment wurde das Reporterplasmid *pCol3a1-500bp-luc* eingesetzt. Zwei Stunden nach Transfektion des Reportervektors wurden nach dem Mediumwechsel die Inhibitoren mit einer Konzentration von 10 μ M zugefügt. Der Positivkontrolle wurde anstatt der Inhibitoren das äquivalente Volumen an DMSO hinzugefügt um Effekte von DMSO auszuschließen. Nach 8 h erfolgte, wie zuvor beschrieben, die Zellyse und Detektion der Luc- Signale.

Es zeigte sich, dass die durch TrkA induzierte Luc- Aktivität durch Einsatz des ERK1/2 Inhibitors U0126 nicht verändert war. Wurde jedoch die p38 MAPK inhibiert, zeigte sich eine deutliche Reduktion der Luc- Aktivität um ca. 50 %. Die eingesetzten Negativkontrollen zeigten kaum detektierbare Luc- Aktivitäten (Abb. 16D).

Hieraus wurde geschlossen, dass NGF durch die Aktivierung des Rezeptors TrkA über p38 MAPK die Kollagentranskription induziert. Außerdem konnte der ERK1/2- Signalweg in Bezug auf die *col3(α 1)*- Induktion durch NGF ausgeschlossen werden.

3.7.2 NGF induziert die Kollagen III Expression in primären Lungenfibroblasten über die p38 MAPK

In vorhergehendem Experiment konnte gezeigt werden, dass für die Aktivierung der *col3(α 1)*- Transkription der p38 MAPK Signalweg über TrkA aktiviert wird. Da es sich bei HEK293 Zellen nicht um Fibroblasten handelt, sollte in folgendem Versuch untersucht werden, ob NGF auch in primären Lungenfibroblasten den p38 MAPK Signalweg nutzte um die Kollagen-III- Expression zu induzieren.

Hierfür sollte durch Zugabe des im vorhergehenden Versuch getesteten Inhibitors, SB202190, die *col3(α 1)* mRNA Expression untersucht werden. Es wurde in diesem Fall

von der Inhibition über einen Zeitraum von 8 h abgesehen, da primäre Zellen im Vergleich zu Zelllinien sensibler auf unterschiedliche Kulturbedingungen reagieren. Zunächst wurde geprüft, ob der gewählte Inhibitor die Vitalität der Zellen beeinflusst. Hierfür wurde MLF der Inhibitor und das Solvent DMSO, im gleichen Volumenverhältnis, für 30 min beigefügt. Als vitale Zellen, Positivkontrolle, wurden Zellen ohne Vorbehandlung mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche mit 20 % (v/v) DMSO kultiviert wurden. Nach Ablauf der Prä-Inkubation erfolgte der Mediumwechsel und die Zugabe des Substrats für die mitochondrialen Dehydrogenasen MTS (2.19). Nach 8 h, die Zeitspanne die für die Untersuchung der mRNA- Expression und Transkriptionsaktivierung eingehalten wurde, wurde die Absorption wie unter (2.19) beschrieben gemessen. Die Absorptionswerte der Positivkontrolle wurden auf 100 % und jene für die unterschiedlichen Stimulationsbedingungen zu dieser in Relation gesetzt.

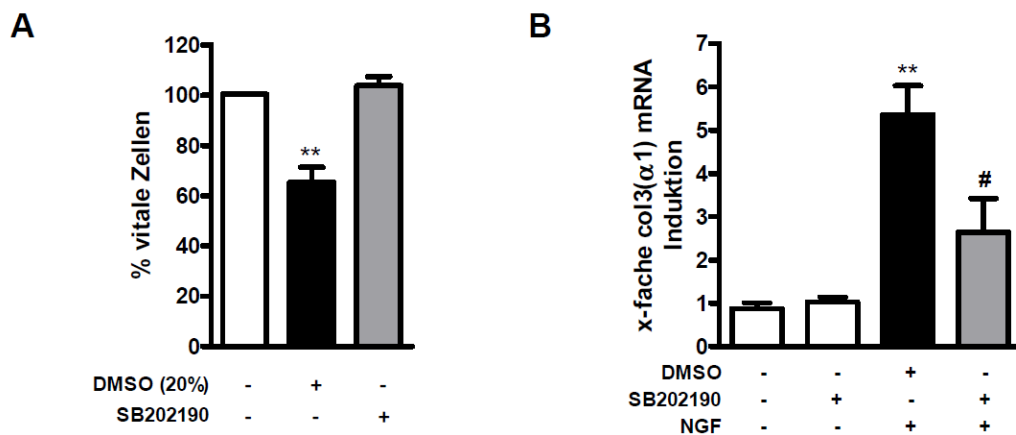


Abb.17 NGF induziert die col3(α1)-mRNA Expression in Lungenfibroblasten über die Aktivierung der p38 MAPK *in vitro*.

(A) Die Zytotoxizität des p38 MAPK-Inhibitors wurde bestimmt. (B) Bestimmung der col3(α1)-mRNA Expression nach NGF-Stimulation mit und ohne Vorbehandlung mit SB202190. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM von n=4-5 Bestimmungen pro Gruppe. **p<0.01 gegenüber Kontrolle, #p<0.05 gegenüber DMSO+NGF.

Hierbei zeigte sich, dass die eingesetzte Menge des spezifischen Inhibitors sich nicht negativ auf die Zellvitalität auswirkte. Im Vergleich hierzu war durch die Zugabe hoher Mengen an DMSO (20 % v/v) eine deutliche Abnahme der Zellvitalität zu beobachten. Somit war gewährleistet, dass die eventuellen Unterschiede in der mRNA Expression nicht auf eine veränderte Stoffwechselaktivität der Zellen zurückzuführen waren (Abb. 17A).

Um die Abhängigkeit der col3(α 1)- mRNA Expression von p38 MAPK zu untersuchen wurden MLF mit dem Inhibitor SB202190 (10 μ M) und in gleichem Volumenverhältnis DMSO vorbehandelt. Nach 30 min erfolgte die Stimulation mit NGF (100 ng/ml) für 8 h. Als Negativkontrolle wurden nicht vorbehandelte und unstimulierte Zellen mitgeführt. Es folgte die quantitative Bestimmung der relativen col3(α 1)- mRNA Expression mittels RT-PCR. Hierbei zeigte sich, dass die Inhibition der p38 MAPK eine signifikante Abnahme der NGF- induzierten col3(α 1) mRNA-Expression im Vergleich zur Positivkontrolle zur Folge hatte (Abb. 17B).

Hieraus wurde geschlossen, dass NGF auch in primären Lungenfibroblasten zur Induktion der col3(α 1)- mRNA Expression den p38 MAPK- Signalweg nutzt.

3.8 TGF β 1- Abhängigkeit der NGF- induzierten Kollagenexpression

3.8.1 NGF aktivierte p38 MAPK zur Kollagen III- Induktion mündet nicht in den TGF β 1/SMAD- Signalweg *in vitro*

Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen kann eine Erhöhung der lokalen TGF β 1- Konzentration gemessen werden. Diese erhöhten Zytokin- Spiegel werden mit den darauf folgenden strukturellen Veränderungen assoziiert. Die TGF β 1- Signalgebung über die SMAD- Proteine wird für die Kollageninduktion als Hauptsignalweg betrachtet. Die, durch den Rezeptor aktivierten, SMAD2 und SMAD3- Proteine binden nach ihrer Phosphorylierung an SMAD4 um in den Kern zu gelangen, wodurch SMAD4 eine zentrale Rolle in diesem Signalweg einnimmt. Eine Beeinflussung dieses Signalweges durch MAPK wurde beschrieben, so dass diese die Phosphorylierung des SMAD2 und SMAD3 steigern können und somit einen additiven Effekt auf die TGF β 1- Signalgebung ausüben. Es sollte daher untersucht werden, ob die durch NGF induzierte p38 MAPK einen eigenständigen Signalweg zur Kollagen III- Induktion darstellte, oder in den TGF β 1/SMAD- Signalweg mündete.

Um eine Abhängigkeit oder mögliche Interaktion beider Signalwege zu untersuchen, wurden über RNAi induzierte *knock down* Experimente angeschlossen. Es sollte in MLF die col3(α 1)- mRNA Expression nach spezifischem *knock down* des NGF- Rezeptors TrkA und des zentralen TGF β 1- Signalmolekül SMAD4 untersucht werden. Zunächst wurde die Effektivität der eingesetzten spezifischen siRNA bestimmt.

MLF wurden, wie unter 2.18.1 beschrieben, mit entweder einer unspezifischen (*scrambled siRNA*, *scsiRNA*) oder der spezifischen siRNA gerichtet gegen TrkA (siTrkA) und SMAD4 (siSMAD4) transfiziert. Die Effektivität der siRNA wurde auf Proteinebene 24 h nach erfolgter Transfektion bestimmt. Es wurden Proteine aus transfizierten MLF gewonnen und über eine SDS-Page mit angeschlossenenem Immunoblot analysiert. Die Transfektion mit der *scsiRNA* diente hierbei als Negativkontrolle. Als Beladungskontrolle wurde zudem das *housekeeping* Protein β -actin detektiert. Der *knock down* wurde durch die densitometrische Messung der Bandenintensität von TrkA, welche auf die Intensität von β -Actin normalisiert wurde, ermittelt. Die Intensität der Transfektionskontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Die Intensität der siTrkA- und siSMAD4- Bande wurde zu dieser ins Verhältnis gesetzt.

Es zeigte sich, dass die Transfektion mit den spezifischen siRNA zu einem deutlichen *knock-down* des Zielproteins führte. Hierbei war eine Reduktion der Proteinexpression für TrkA um ca. 90 % und für SMAD4 um ca. 60 % zu beobachten (Abb.18A).

Um die Abhängigkeit des NGF- Signalwegs von TGF β 1 zu untersuchen, galt es TrkA und SMAD4 vor der Stimulation mit NGF auszuschalten.

MLF wurden, wie bereits beschrieben, ausgesät und über RNAi wurde der Protein *knock down* für 24 h mit siTrkA und siSMAD4 durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend mit NGF (100 ng/ml) und TGF β 1 (20 ng/ml) für 8 h stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Zellen die nicht transfiziert wurden und unstimuliert blieben. Als weitere Kontrollgruppen dienten Zellen, die mit einer unspezifischen *scsiRNA*, und den spezifischen siRNAs siTrkA und siSMAD4 transfiziert und unstimuliert blieben. Die col3(α 1)-Expression wurde auf mRNA Ebene mittels RT-PCR quantitativ bestimmt.

Es zeigte sich, dass die alleinige Transfektion beider spezifischer siRNA die col3(α 1)-mRNA-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle nicht beeinflussten. Die alleinige Stimulation mit den Wachstumsfaktoren NGF und TGF β 1 führten zu einem deutlichen Anstieg der col3(α 1)- mRNA Expression. Hierbei war kein Unterschied zwischen NGF und TGF β 1 zu erkennen. Es war ein Anstieg um das 3-fache gegenüber unstimulierten Zellen zu beobachten. Wurden siTrkA transfizierte Zellen mit NGF stimuliert, blieb die col3(α 1)- mRNA Induktion durch NGF aus. Wurden aber siSMAD4-transfizierte Zellen mit NGF stimuliert, war ein deutlicher Anstieg in der mRNA-Expression zu erkennen. Des Weiteren war zu beobachten, dass in MLF der TGF β 1 den SMAD- Signalweg für die col(3 α 1) mRNA Induktion aktiviert, da nach siSMAD4 Transfektion die TGF β 1-Stimulation keine Induktion mehr vermittelte (Abb.18B).

Hieraus ließ sich schließen, dass der NGF aktivierte TrkA/p38 MAPK Signalweg nicht in den TGF β 1/SMAD –Signalweg mündete und somit einen eigenständigen Signalweg zur Induktion der col3(α 1)- mRNA Expression darstellt.

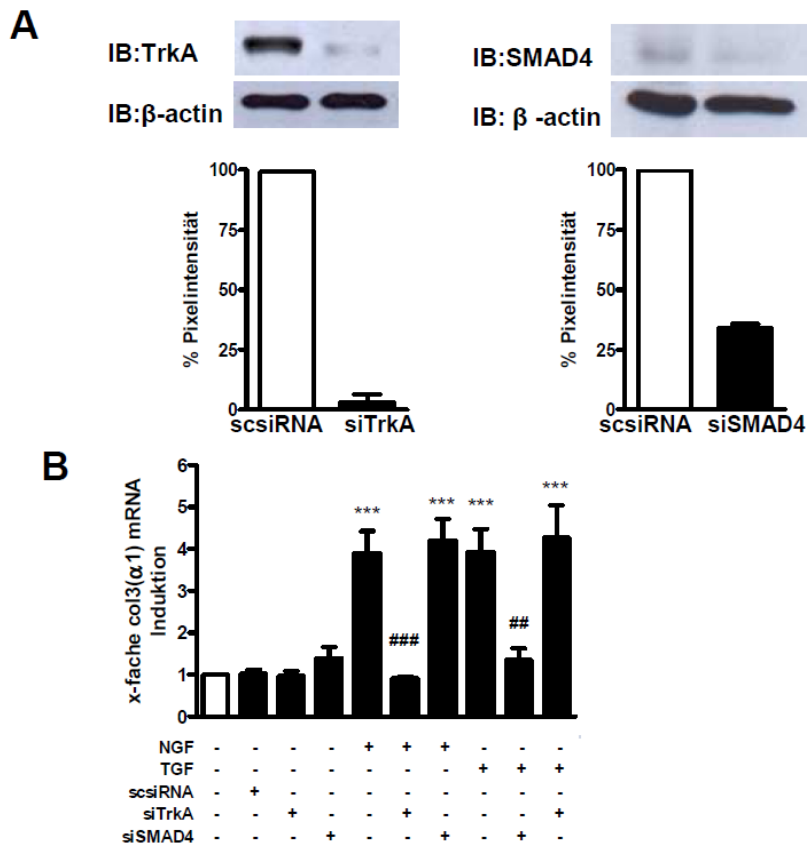


Abb.18 NGF induziert die col3(α 1)-mRNA Expression in Lungenfibroblasten unabhängig vom TGF β 1/SMAD-Signalweg.

(A) Immunoblot nach RNAi vermitteltem *knock down* des NGF-Rezeptors TrkA und des zentralen TGF β 1/SMAD-Signalmoleküls SMAD4. (B) Bestimmung der col3(α 1)-mRNA Expression mittels RT-PCR nach RNAi knock down und anschließender Stimulation mit NGF oder TGF β 1. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4-5 Bestimmungen pro Gruppe. ***p<0.001 gegenüber Kontrolle, ##p<0.01 gegenüber TGF β 1 und ###p<0.001 gegenüber NGF.

3.8.2 NGF-Tg Mäuse weisen keine erhöhten TGF β 1- Konzentrationen auf

Da für NGF die Induktion von TGF β 1 *in vitro* beschrieben wurde (Micera et. al. 2005), war es von Interesse zu untersuchen, ob die verstärkte Kollagenablagerung durch die Induktion von TGF β 1 entstanden. Um dies zu untersuchen wurde das *in vivo* System der NGF-Tg Maus mit stark erhöhten NGF-Spiegeln gewählt. Würde NGF die Expression von TGF β 1 induzieren, müsste in den Atemwegen NGF-Tg- Mäuse stark erhöhtes TGF β 1 nachzuweisen sein. TGF β 1 wird als inaktives Pro-Protein sezerniert und durch das Bindeprotein *latent-binding protein* an Zellmembranen gebunden. Dieses Pro-Protein wird durch enzymatische Spaltung während einer Entzündung in die aktive Form überführt und kann dann seine Wirkung entfalten. Es war davon auszugehen, dass in einem nicht-entzündlichen Milieu wenig aktives TGF β 1 vorliegt und der Großteil des TGF β 1 als latente Form membrangebunden vorlag. Die Gesamt-TGF β 1- Spiegel in den Atemwegen wurden mittels ELISA bestimmt.

Die Lungen naiver WT- und NGF-Tg Mäuse im Alter von 6-8 Wochen wurden lavagiert und die BAL- Flüssigkeit gewonnen. In der BAL wurde die Bestimmung der Gesamt-TGF β 1 Konzentrationen mittels ELISA durchgeführt (2.17.1.2). Durch Ansäuern der Proben wurde die Spaltung der Pro-Proteine induziert.

Die Bestimmung ergab weder für WT- noch NGF-Tg- Mäuse nachweisbare TGF β 1-Konzentrationen in der BALF. Für beide Gruppen lagen die Werte unter der vom Hersteller angegebenen Untergrenze und wurden als nicht detektierbar (n.d.) eingestuft (Abb. 19A).

Da NGF-Tg Mäuse jedoch auch ohne Entzündung strukturelle Veränderungen in den Atemwegen aufweisen, wurde untersucht, ob bioaktives TGF β 1 im Lungengewebe vorlag. Die lavagierten Lungen wurden homogenisiert (2.17.1.2) und die TGF β 1-Konzentration mittels ELISA pro mg Gewebe bestimmt. Für die Messung von aktivem TGF β 1 wurde auf die Ansäuerung und damit verbunden die Aktivierung der Pro-TGF β 1 Moleküle verzichtet.

Es zeigte sich, dass sich die gemessenen TGF β 1- Spiegel zwischen WT- und NGF-Tg-Mäusen nicht unterschieden. Während die TGF β 1-Konzentration in WT- Tieren $15,51 \pm 4,08$ pg/mg betrug, lagen diese in NGF-Tg- Mäusen bei $18,16 \pm 5,70$ pg/mg (Abb. 19B).

Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die strukturellen Veränderungen in NGF-Tg- Mäusen nicht auf eine erhöhte TGF β 1- Produktion zurückzuführen waren.

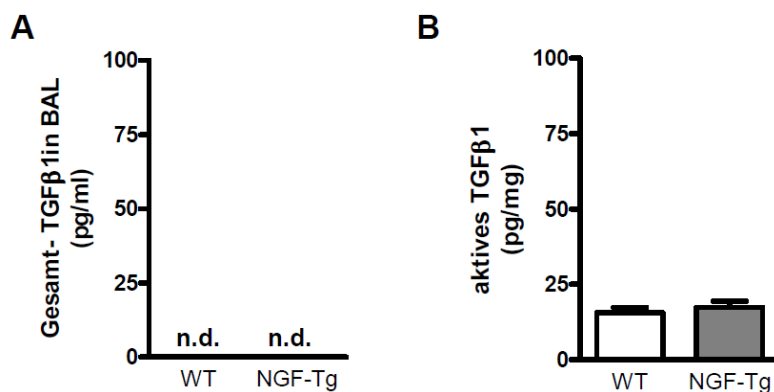


Abb.19 TGF β 1-Spiegel sind in den Atemwegen und der Lunge NGF-Tg Mäuse nicht erhöht.

Die Konzentrationen von Gesamt- TGF β 1 in der BALF (A) und aktivem TGF β 1 im Lungenhomogenisat (B) wurde in naiven WT- und NGF-Tg- Mäuse mittels ELISA bestimmt. n.d.= nicht detektierbar; n=6.

4. DISKUSSION

Strukturelle Veränderungen in den Atemwegen asthmatischer Patienten stellen ein Charakteristikum dieser chronisch entzündlichen Erkrankung dar. Als dominante histologische Veränderung tritt neben der Becherzellmetaplasie und der verdickten Muskelzellschicht die subepitheliale Fibrose auf. Während für diese strukturellen Veränderungen kausale Zusammenhänge mit den pathophysiologischen Merkmalen des Asthma bronchiale, wie der Verschlechterung der Lungenfunktion über die Progression der Erkrankung, aufgezeigt werden konnten, sind die molekularen Mechanismen dieser histopathologischen Veränderungen bisher noch nicht verstanden. In diesem Zusammenhang sollte die Rolle des Neurotrophins NGF für die Ausbildung der subepithelialen Fibrose untersucht werden. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass (1.) strukturelle Veränderungen im experimentellen chronischen Asthma von erhöhten NGF- Konzentrationen begleitet werden und die Suppression der biologischen NGF- Aktivität in diesem Modell die Ablagerung von Kollagenen verhindert. (2.) Erhöhte NGF-Konzentrationen in NGF-Tg Mäusen verursachten, unabhängig von einer lokalen Entzündung und unveränderten TGF β 1-Spiegeln, die verstärkte Ablagerung von Kollagenen in den Atemwegen. (3.) Die veränderte Lungenmorphologie in NGF-Tg Mäusen ging mit einer Beeinträchtigung der Lungenphysiologie einher. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kollagenablagerung auf einen (4.) direkten Effekt von NGF auf Lungenfibroblasten zurückgeht und dieser über die Aktivierung des TrkA/p38 MAPK- Signalwegs vermittelt wurde. Zudem konnte gezeigt werden, dass (5.) der TrkA/p38 MAPK- Signalweg einen eigenständigen Signalweg zur Kollagenexpression darstellt und nicht in den TGF β 1/SMAD- Signalweg mündet.

NGF wirkt als pro-fibrotischer Faktor im Asthma bronchiale

Das Asthma bronchiale wird mit seinen strukturellen Veränderungen als eine chronische Wunde der Atemwege verstanden, welche aufgrund ihrer Exposition gegenüber einer Vielfalt an Umweltantigenen und Noxen nicht heilt. Die Initiation der Entzündungsreaktion geht von dem Atemwegsepithel aus. Es bildet als „*first line of defense*“ eine Abgrenzung zwischen dem Lungengewebe und der Umwelt. Das Epithel stellt sowohl eine physikalische als auch eine immunologische Barriere dar. Aus klassischer Sicht wird die Entzündungsreaktion durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems über *pattern recognition receptors*, wie z.B. *toll-like receptors* (TLR), in

den Atemwegen gestartet. Als immunologisch aktive Zellen nehmen Makrophagen und DCs, welche mit einer Reihe von Mustererkennungsrezeptoren ausgestattet sind, gefährliche Umweltstoffe oder Allergene auf, prozessieren diese und induzieren im drainierenden LK die adaptive Immunantwort (1.1). Diese wird von T_H2- Zellen dominiert. Das von T_H2-Zellen gebildete IL-5 vermittelt die Reifung von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark, welche durch die Chemokine Eotaxin und RANTES in die Atemwege rekrutiert werden. Dort angekommen schädigen diese Zellen mit der Freisetzung toxischer Metabolite EPX, MBP und ECP das Gewebe (Fireman, 2003). Als Reaktion setzt dieses neben pro-inflammatorischen Zytokinen auch Wachstumsfaktoren frei, welche den Gewebeschaden „reparieren“ sollen. Es ist daher anzunehmen, dass die repetitive Begegnung mit einem Allergen die Produktion epithelialer Wachstumsfaktoren während einer chronischen Atemwegsentzündung im Übermaß induziert und diese auf die in der Nähe lokalisierten Myo-/Fibroblasten wirken. Ein solches Signal der Epithelzellschicht aktiviert eine Kaskade an Ereignissen, die neben der eigenen Proliferation auch die hierzu benötigte Matrix induziert. Während der initialen Wundheilung muss die provisorische Matrix Flexibilität besitzen, damit proliferierende Zellen den Kontakt zu benachbarten Zellen aufrecht erhalten können, aber gleichzeitig sich in die Wunde bewegen können um diese zu schließen. Diese Matrix darf allerdings nicht zu stabil sein, damit sie nach Abschluss der Heilung wieder abgebaut werden kann. Als Hauptbestandteil der Matrix werden Kollagenfasern verstärkt synthetisiert und abgelagert. In den Atemwegen werden neben dem ubiquitär vorkommenden Kollagen Typ I, die Typen III und in sehr geringem Maße Typ V exprimiert. Das Kollagen III, flexibler und instabiler als Kollagen I, wird während der Wundheilung verstärkt exprimiert und kann den Anteil von Kollagen I übersteigen (Robins et al., 2003). Grund hierfür ist, neben der gesteigerten Syntheserate, auch die Zunahme des Pools an Kollagen sezernierenden Zellen durch Proliferation der lokalen Fibroblasten aber auch durch Rekrutierung von Fibrozyten (Bucala et al., 1994). Für die effektive Wundheilung ist die koordinierte Interaktion von Epithelzellen und benachbarten Fibroblasten entscheidend ist. Ein etwaiges Ungleichgewicht in diesem Prozess, wie die erhöhte Freisetzung pro-fibrotischer Zytokine, kann zur pathologischen Fibrosierung führen (Werner and Grose, 2003). Somit stellen Wachstumsfaktoren, welche von Epithelzellen sezerniert werden und wundheilungsfördernde Eigenschaften besitzen, geeignete Kandidaten dar, fibrotische Umbauprozesse zu vermitteln.

Über die Rolle von NGF als pro- fibrotischen Faktor im Asthma bronchiale sind kaum Erkenntnisse vorhanden. Jedoch deuten unterschiedliche Arbeiten auf eine solche potentielle Rolle hin. So zeigten Bonini et. al., dass die NGF-Konzentrationen im Serum

allergischer Patienten im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht waren. Sie konnten zudem zeigen, dass die NGF-Konzentrationen mit dem Schweregrad der allergischen Erkrankung korrelierten (1996). Eine weitere Arbeit belegte, dass in den Atemwegen asthmatischer Patienten die Expression von NGF im Vergleich zu Gesunden deutlich erhöht war (Olgart et al., 2002). Die Arbeit von Virchow et. al. hebt die Bedeutung von NGF in der allergischen Atemwegsentzündung hervor. Hier konnten die Autoren zeigen, dass nach pulmonaler Allergenprovokation die NGF-Konzentrationen in der bronchialen Lavage weiter gesteigert werden konnten (1998). Als Quellen für NGF konnten das Atemwegsepithel, glatte Muskelzellen und die Zellen des Infiltrats asthmatischer Patienten identifiziert werden (Olgart et al., 2002). Unterschiedliche Untersuchungen zeigten, dass neben der Expression von NGF auch die Rezeptoren im Epithel auf Phasen der Proliferation beschränkt sind (Kawamoto and Matsuda, 2004; Nithya et al., 2003). Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass auch im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung das aktivierte Epithel erhöhte Mengen an NGF sezerniert (Hahn et al., 2006). Eine biologische Funktion in Reparaturprozessen konnte in einem Modell der selektiven Klara-Zell-Depletion mittels Naphthalin aufgezeigt werden. Hier zeigte sich eine deutliche Verzögerung der epithelialen Proliferation nach NGF- Neutralisierung durch einen AK (Sonar et al., 2010). Dies bedeutet, dass NGF, entweder als autokriner Faktor oder auch parakrin, epitheliale Reparaturprozesse vermittelt. Die epitheliale Proliferation alleine kann jedoch die Wundheilung nicht vollbringen. Für ihre Proliferation und Migration benötigen diese Zellen eine Matrix, welche von benachbarten Fibroblasten sezerniert wird. Micera et. al. zeigten die Expression der NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} auf humanen Lungenfibroblasten (Micera et al., 2001a). Dass Fibroblasten eine Zielzelle für NGF darstellen, konnte auch für Fibroblasten aus der Dermis gezeigt werden (Hasan et al., 2000). Hier zeigten *in vitro* Experimente, dass durch NGF die Prozesse der Migration, der Differenzierung zum Phänotyp des Myofibroblasten aber auch die Kontraktion dieser Zellen vermittelt wird (Micera et al., 2001a). Diese Ereignisse stellen wichtige Prozesse während der Wundheilung dar. Auch in unterschiedlichen klinischen Studien konnte die wundheilungsfördernde Aktivität von NGF beobachtet werden (Bernabei et al., 1999; Bonini et al., 2000; Lambiase et al., 1998). Über die Beteiligung von NGF in der fehlgeleiteten Wundheilung, welche in der Fibrosierung von Geweben münden kann, sind kaum Erkenntnisse vorhanden.

In dieser Arbeit konnte die Beteiligung von NGF an pathologischen Reparaturprozessen anhand *in vitro* und *in vivo* Experimenten aufgezeigt werden. Experimente an isolierten Lungenfibroblasten aus der Maus zeigten, dass NGF über die Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs die Expression des Kollagen III induziert.

Diese Daten werden durch Untersuchungen in NGF-Tg Mäusen unterstützt. NGF-Tg Mäuse weisen in naiven Zustand eine stärkere bronchiale Kollagenablagerung auf, die sich ohne veränderte TGF β 1-Spiegel ausbildete. Im Modell des experimentellen chronischen Asthmas war zu beobachten, dass die NGF- Spiegel, welche im naiven Zustand auf sehr niedrigem Niveau vorlagen, durch die Langzeitprovokation (chronisch) deutlich gesteigert werden konnten. Die höchsten Konzentrationen waren in einer Phase, welche von strukturellen Veränderungen begleitet war, zu detektieren. Die Rolle als pro-fibrotischer Faktor konnte durch die Neutralisierung von NGF im Modell der chronischen Entzündung verdeutlicht werden. Hier war zu beobachten, dass sich bei Blockierung der NGF- Aktivität die subepitheliale Fibrose vermindert ausbildete. Dies spiegelte sich neben dem abgelagerten Kollagenband im subepithelialen Bereich der Atemwege auch in der mRNA Expression des Kollagen III im Lungengewebe wider. Diese starke Induktion der Kollagenablagerung, als Teil der vermehrt abgelagerten Matrix, in OVA behandelten Mäusen könnte das Resultat der direkten NGF- Wirkung auf Strukturzellen sein. Die NGF Rezeptoren werden auf Fibroblasten exprimiert. In einem Entzündungs- Milieu könnte NGF auf Fibroblasten einwirken und die Produktion von Kollagen-III induzieren.

Aber aufgrund der Komplexität des Lungengewebes und des experimentellen Systems der chronisch allergischen Atemwegsentzündung war es nicht möglich einen direkten Effekt von NGF auf Strukturzellen zu beschreiben. Auch wenn die Applikation des anti-NGF- AK im Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung eine deutlich geringer ausgebildete bronchiale Kollagenablagerung zeigte, war gleichzeitig eine abgeschwächte Entzündung im Lungengewebe zu beobachten. Hierbei waren die Anzahl der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Lymphozyten stark reduziert. Die anti-NGF AK-Applikation wurde erst nach Ausbildung der adaptiven Immunantwort auf das Allergen OVA durchgeführt. Hierdurch sollte ausgeschlossen werden, dass durch die frühzeitige Neutralisierung von NGF, eine schwächere Immunisierung der Versuchstiere erfolgt. Der Einfluss von NGF auf die Ausbildung einer allergischen Atemwegsentzündung, die bei jedem Allergen- Kontakt erneut induziert wird, ist durch unterschiedliche *in vivo*- und *in vitro*- Experimente belegt. Hierbei ist der Einfluss sowohl auf Zellen des angeborenen als auch Zellen des adaptiven Immunsystems beschrieben. DCs, die bei jeder Allergenprovokation Ag aufnehmen, dieses prozessieren und T-Helferzellen aktivieren, nehmen als Initiatoren der allergischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle ein. Über die Regulation durch NGF sind bisher kaum Erkenntnisse vorhanden. Jiang et al. konnten zeigen, dass die NGF-Stimulation Lipopolysaccharid (LPS)- gepulster immaturer DCs zu einer stärkeren Aktivierung dieser Zellen führte. Sie konnten die gesteigerte Expression der

Aktivierungsmarker CD80 und CD86 auf DCs und die erhöhte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigen (Jiang et al., 2007). Die Neutralisierung von NGF könnte somit in einer schwächeren Aktivierung dieser Zellen in der allergischen Atemwegsentzündung resultiert haben.

In differenzierten T_H2- Zellen zeigt NGF eine aktivierende Wirkung, so dass die exogene NGF-Gabe eine erhöhte Sekretion ihres Markerzytokins IL-4 (Ehrhard et al., 1994) bewirkte. Eine aktivierende Wirkung von NGF auf T_H1-Zellen konnte allerdings nicht gezeigt werden (Bayas et al., 2003). Da T_H2- Zellen eine zentrale Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Erkrankungen (Wynn, 2004) einnehmen, könnte die Neutralisierung von NGF im Mausmodell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung eine reduzierte Aktivierung von T_H2- Zellen zur Folge gehabt haben. Diese reduzierte Aktivierung könnte sich in der geringeren Freisetzung der T_H2-spezifischen Zytokine IL-5 und IL-13 niederschlagen haben. Geringere IL-13-Spiegel könnten zu einer reduzierten Differenzierung epithelialer Zellen zu Mukus produzierenden Zellen geführt haben. Die geringere Freisetzung von IL-5 könnte die geminderte Reifung eosinophiler Granulozyten im Knochenmark nach sich gezogen haben. Diese geringeren Anzahlen an eosinophilen Granulozyten wiederum könnten eine geringere Gewebeschädigung verursacht haben, bei der die Freisetzung epithelialer Wachstumsfaktoren geringer ausfiel.

Auch für B- Lymphozyten ist eine Wirkung von NGF beschrieben. So stimuliert NGF deren Differenzierung, Proliferation und AK-Produktion (Kimata et al., 1991; Otten et al., 1989). NGF fördert über die Aktivierung der p38 MAPK das Überleben von Gedächtnis-B- Zellen (Torcia et al., 1996). Die kontinuierliche AK- Produktion durch Plasmazellen spielt für die Induktion und Perpetuation der allergischen Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. Die gebildeten IgE-AK, welche gebunden an Fc ϵ R1 auf Mastzellen und basophilen Granulozyten zu finden sind, aktivieren diese Zellen nach ihrer Quervernetzung durch das Allergen. Mastzellen wiederum setzen Zytokine, Histamin und Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels wie Leukotriene und Prostaglandine frei, die maßgeblich zur Hyperreagibilität der Atemwege beitragen (Wills-Karp, 1999). Zu den sezernierten Zytokinen gehört IL-4, welches zu einer gesteigerten T_H2-Differenzierung und Perpetuation der allergischen Entzündungsreaktion führt. Die repetitive Allergen-Provokation induziert wiederholt die Proliferation und Reifung Ag-spezifischer AK- sezernierender Plasmazellen. Basierend auf den Erkenntnissen zur Regulation dieser Population durch NGF, wäre durch die Neutralisierung von NGF eine Abnahme der Immunglobulin -Titer zu erwarten gewesen. Hingegen dieser Erwartung war für keine der untersuchten Subklassen, OVA-spez.- IgG1 und -IgE, eine Beeinträchtigung zu erkennen. Auch aufgrund der abgeschwächten

Entzündungsreaktion, und somit verbunden einer „abgeschwächten“ Aktivierung dieser Zellen wäre eine Reduktion in anti-NGF behandelten Mäusen zu erwarten gewesen. Ein Grund für dieses unerwartete Ergebnis könnte der Zeitpunkt der AK-Applikation sein, welche nach systemischer Immunisierung stattfand. Die 3-malige Immunisierung der Versuchstiere mit dem Allergen induzierte bereits eine Gedächtnis-B-Zell-Population, die neben der Milz auch in das Knochenmark auswandern konnte und dort, entweder durch lösliche Faktoren oder durch Interaktion mit Stromazellen überlebte und AK produzierte. Obwohl für NGF eine überlebensfördernde Wirkung auf B-Gedächtniszellen beschrieben ist, könnte dies bedeuten, dass NGF in der *in vivo* Situation eine untergeordnete Rolle spielt. Das Überleben der AK-sezernierenden Plasmazellen könnte durch die kombinatorische Wirkung von IL-5, IL-6, TNF α , *stromal derived factor- 1 α* (SDF-1 α) und CD44-Liganden in Unabhängigkeit von NGF vermittelt worden sein (Cassese et al., 2003).

Bei der Analyse der Lymphozytenpopulation in der BAL wurde zwar nicht zwischen T- und B-Zellen unterschieden, jedoch deuten die beschriebenen Beobachtungen darauf hin, dass die Reduktion in der Anzahl auf die B-Zell-Population zurückgeht. Während für B-Lymphozyten durch NGF die Differenzierung, Proliferation und Induktion anti-apoptotischen *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) beschrieben ist (Torcia et al., 1996), fehlen solche Erkenntnisse für T_H2-Zellen.

Die starke Reduktion der eosinophilen Granulozyten in der BAL anti-NGF behandelter Tiere lässt sich, neben der Rolle bei der Aktivierung von T_H2-Zellen, durch das fehlende Überlebenssignal erklären. Für NGF ist sowohl im murinen (Hahn et al., 2006) als auch humanen (Nassenstein et al., 2003b) System eine „trophe“ -Wirkung auf eosinophile Granulozyten beschrieben. Eine Neutralisierung des Überlebenssignals NGF hätte in Zellen, die *per se* eine begrenzte Lebensspanne haben, die frühzeitigere Apoptose zur Folge.

Neutrophile Granulozyten werden in Mausmodellen der akuten allergischen Atemwegsentzündung kaum detektiert, während sie in Modellen der chronischen Atemwegsentzündung, wenn auch in geringer Anzahl, nachgewiesen werden können. Sie werden, anders als eosinophile Granulozyten, direkt nach Gewebeschädigung durch den Komplementfaktor C5a und Chemokine, wie *macrophage inflammatory protein 1 alpha* (MIP-1 α), MIP-2 und KC (in der Maus) rekrutiert (McDonald and Kubes, 2010). Nach phagozytotischer Aktivität werden sie in einem Zeitraum von 72h durch Apoptose eliminiert. Da sich der Analysezeitpunkt nach finaler Allergenprovokation in beiden Mausmodellen nicht unterschied, scheint es in der chronischen Situation zur verstärkten Rekrutierung dieser Zellen zu kommen. Eine Möglichkeit, neben den bereits genannten Chemokinen, stellen Produkte des Kollagenabbaus dar. Auf

Entzündungsreiz hin, werden neutrophile Granulozyten rekrutiert, die über die Freisetzung von MMPs die Spaltung von Kollagenmolekülen induzieren können. Als Abbauprodukt entsteht das Tripeptid Prolin-Glycin-Prolin (Pro-Gly-Pro, PGP), welches chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten wirkt (Barnes, 2010). Das PGP selbst induziert eine transiente Entzündung, kann aber in der acetylierten Form als N- α -PGP, welche die potentere Form darstellt, die gesteigerte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten induzieren (Weathington et al., 2006). Sowohl in Mausmodellen als auch in Lavagen von COPD-Patienten kann N- α -PGP nachgewiesen werden (Weathington et al., 2006). Da als Enzym MMP9 diese Spaltung bewerkstelligen kann und in der Asthma Pathologie diskutiert wird (Corry et. al., 2004), könnte dies als Folge der gesteigerten MMP9-Aktivität erfolgt sein. Die geringere Anzahl der neutrophilen Granulozyten in anti-NGF behandelten Mäusen könnte somit, neben der anti-apoptotischen Wirkung von NGF auf diese Zellen, durch die geringere Rekrutierung als Folge der abgeschwächten Fibrosierung und Entzündung resultiert sein.

Da in diesem Modell der anti-NGF AK 24h vor jeder Provokationsphase systemisch verabreicht wurde, ist anzunehmen, dass es, über die Wirkung von NGF auf DCs und T_H2-Zellen, zum einen zu einer reduzierten Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten aus dem Knochenmark kam. Zum anderen ist anzunehmen, dass durch Neutralisierung des Überlebenssignals im Lungengewebe, viele dieser Zellen vorzeitig durch Apoptose eliminiert wurden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Verhinderung der lokalen Entzündung in diesem Modell zur abgeschwächten Kollagenablagerung beitrug.

Im Umkehrschluss deuten die Daten allerdings auch an, dass NGF an der Chronifizierung der Entzündungsreaktion maßgeblich beteiligt ist. Durch seine Wirkung auf alle zentralen Zellen der allergischen Entzündung, wie DCs, T_H2- Zellen, eosinophile und neutrophile Granulozyten, trägt NGF zur Bildung dieses *circulus vitiosus* bei. NGF wird nahezu von allen Immunzellpopulationen in der allergischen Entzündung und Strukturzellen gebildet. Die Amplifikation der T_H2-vermittelten Immunantwort hätte neben der verstärkten Freisetzung von NGF durch IgE aktivierte Mastzellen, eosinophilen Granulozyten und Strukturzellen auch die starke Beschädigung des Lungengewebes zur Folge. Als Antwort auf den Gewebeschaden würde NGF wiederum durch das verletzte Epithel freigesetzt, was neben der Reparatur einen weiteren Entzündungszyklus zur Folge hätte. Durch seine überlebensfördernde Wirkung auf Leukozyten, würde die erhöhte NGF- Freisetzung eine weitere Gewebeschädigung durch die überlebenden Entzündungszellen verursachen. Als Folge wäre, neben der weiteren Steigerung der NGF-Konzentrationen, die vermehrte

Synthese und Ablagerung des Kollagen III durch Fibroblasten zu beobachten. Es wäre also gerechtfertigt die Schlussfolgerung zu ziehen, dass NGF durch die Perpetuation der allergischen Entzündung in Kombination mit wundheilungsfördernder Wirkung die Entstehung der subepithelialen Kollagenablagerung vermittelt.

NGF induziert die Kollagenablagerung in Unabhängigkeit einer lokalen Entzündungsreaktion

Die Wundheilung resultiert unter anderem aus der koordinierten Interaktion zwischen freigesetzten epithelialen Wachstumsfaktoren und Fibroblasten. Epithelzellen sezernieren diese Faktoren im ruhenden Zustand nur auf sehr niedrigem Niveau. Bei der Schädigung des Gewebes jedoch, wirken diese Faktoren autokrin auf die Produzenten und auch parakrin auf nahe gelegene Fibroblasten. Als autokrines Signal induzieren diese Faktoren die Proliferation der Epithelzellen. Parakrin bewirken sie die Produktion einer provisorischen Matrix, welche zur Migration der Epithelzellen gebraucht wird. Da bei der Gewebsschädigung Zellen zu Grunde gehen, werden zusätzlich Entzündungszellen rekrutiert, deren Aufgabe darin besteht Zell-Debris zu entfernen. In einem Milieu reich an Aktivierungs- und Überlebenssignalen können neutrophile Granulozyten und Makrophagen, welche beide Matrix- degradierende MMPs sezernieren, zur Beschädigung des Zellverbandes beitragen. Die Präsenz von Entzündungszellen in der „heilenden“ Umgebung, sowie die Vielfalt an sezernierten Faktoren, die sich neben Strukturzellen auch auf Immunzellen auswirken, erschwert die differentielle Identifizierung von Mechanismen, die zur Fibrosierung des Gewebes führen. Da in WT-Tieren NGF im naiven Zustand auf sehr niedrigem Niveau in den Atemwegen exprimiert wird und erst auf einen Entzündungsreiz hin hochreguliert wird, gleichzeitig immunmodulatorische Eigenschaften besitzt, konnte im Mausmodell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung nicht klar zwischen direkter Induktion der Kollagenablagerung und indirekter Beteiligung durch die Beeinflussung der Entzündungsreaktion unterschieden werden. Aus diesem Grund sollte ein Modell, in dem NGF ohne die Induktion einer Entzündungsreaktion, durch etwa ein Allergen oder eine Noxe, in erhöhten Konzentrationen freigesetzt wird, zur Klärung eingesetzt werden. In dem Modell der NGF-Tg Maus wird NGF unter der Kontrolle eines Atemwegepithel spezifischen Promotors (Klara-Zell-Promotor) erhöht exprimiert. Dieses Modell sollte einen selektiven Einblick auf die *in vivo* Funktion von NGF in Bezug auf strukturelle Veränderungen in den Atemwegen liefern. Für *remodeling*-assoziierte Faktoren, wie IL-11 und IL-13, konnte zwar durch transgene Expression in

den Atemwegen die verstärkte Kollagenablagerung beobachtet werden, jedoch war in diesen Modellen bereits in unbehandelten Mäusen eine starke Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen zu beobachten (Tang et al., 1996;Zhu et al., 1999).

In dieser Arbeit durchgeführte histologische Untersuchungen zeigten, dass die Anatomie der Atemwege in NGF-Tg Mäusen deutlich verändert war. Eine Verdickung der Atemwegswand war über den gesamten Bronchialbaum zu beobachten. Im Vergleich zu WT-Mäusen zeigte sich deutlich eine verstärkte subepitheliale Kollagenablagerung sowohl im proximalen als auch distalen Kompartiment der Atemwege. Obwohl NGF, im vorherigen Abschnitt erläutert und in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen belegt, eine immunmodulatorische Eigenschaft besitzt, war in naiven NGF-Tg Mäusen keine Infiltration der Atemwege und des Lungengewebes mit Entzündungszellen zu beobachten. Dies zeigt zum einen, dass NGF *in vivo* keine spontane Chemotaxis von Leukozyten vermittelt. Zum anderen wurde deutlich, dass dieses verdickte Kollagenband auf die erhöhten NGF-Konzentrationen zurückzuführen war, und sich nicht als Folge einer Entzündung manifestierte. Es war auch auszuschließen, dass sie aus einer bereits vorübergegangenen Entzündung resultierte, da auch Jungtiere im Alter von 2 und 14 Tagen keine Entzündung aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Lungenfibroblasten, welche den NGF-Rezeptor TrkA konstitutiv und p75^{NTR} auf NGF-Stimulus hin exprimieren (Micera et al., 2001a), könnten somit durch die lokal erhöhten NGF-Konzentrationen zur Produktion von Kollagenen angeregt worden sein.

Unter physiologischen Bedingungen wird die Matrix durch den stetigen Aufbau und Abbau reguliert. Während Fibroblasten die Matrix synthetisieren und ablagern wird der Abbau durch die Aktivität der MMPs bestimmt. Diese degradieren Kollagene, werden aber selbst durch ihre Inhibitoren den TIMPs reguliert. Für die letztendliche Deposition des retikulären BG im Gewebe wird ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs verantwortlich gemacht. So überwiegt in der chronischen Situation die inhibitorische Aktivität der TIMPs und verhindert die Degradation der exzessiv abgelagerten Matrix. Für NGF ist die Induktion der MMP2 Expression in Endothelzellen (Park et al., 2007) und der MMP9 Expression in glatten Muskelzellen (Dagnell et al., 2007) und Fibroblasten (Micera et al., 2007) beschrieben. Gleichzeitig ist NGF auch in der Lage die TIMP2, den Inhibitor der MMP2, zu induzieren (Jaworski and Perez-Martinez, 2006). Es bliebe hier zu untersuchen, ob neben der Kollageninduktion durch NGF auch die funktionelle Inaktivierung der Matrix-degradierenden MMPs, durch die Induktion der TIMPs, zur Zunahme der subepithelialen Kollagens beitrug. Oder aber, eine erhöhte Expression der MMPs eine vergleichsweise „abgeschwächte“ Kollagenablagerung zur

Folge hatte. Zymographische Untersuchungen zur Aktivität der MMPs an dem Lungengewebe NGF-Tg Mäuse im Vergleich zu WT- Mäusen könnten hier Aufschluss geben.

Beim Vergleich der Kollagenablagerung in den Atemwegen naiver NGF-Tg Mäuse und OVA- exponierter WT-Mäuse fällt auf, dass die Kollagenablagerung in NGF-Tg deutlich geringer ausfiel. Obwohl die NGF- Konzentrationen in Tg- Mäusen um ein Vielfaches höher lagen als in chronisch Allergen provozierten Mäusen, maß die subepitheliale Kollagenschicht in naiven NGF-Tg Mäusen nur ca. 50 % der chronisch allergischen WT-Mäuse. Es wäre anzunehmen gewesen, dass die erhöhten NGF-Spiegel die Kollagen produzierenden Zellen konstitutiv aktivieren und zur verstärkten Kollagenablagerung führen. Ein Grund hierfür könnte die fehlende Entzündungsreaktion in diesem Mausmodell sein. Während dieser werden durch das Epithel pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt, welche Fibroblasten aktivieren. Fibroblasten würden proliferieren und somit den Pool an Kollagen sezernierenden Zellen vergrößern. Da weder in der Literatur noch in eigenen durchgeführten Experimenten eine Förderung der Proliferation in Fibroblasten durch NGF beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde eine Zunahme der Fibroblastenzahl in dieser Maus ausgeschlossen. Da in den Atemwegen NGF-Tg Mäuse keine Anzeichen einer Entzündung vorlagen, war davon auszugehen, dass durch das Fehlen der Faktoren die Anzahl der Fibroblasten ebenfalls nicht verändert war. Während der chronischen Atemwegsentzündung wird das Epithel wiederholt geschädigt und setzt neben Zytokinen auch eine Reihe an Chemokinen frei. Neben der Aktivierung residenter Fibroblasten würden durch Chemokine, wie CCL-2 und CXCL-12, Fibrozyten in die Atemwege rekrutiert werden (Moore et al., 2005;Phillips et al., 2004). Diese Zellen stellen eine zirkulierende Fibroblasten- ähnliche Knochenmarks-Stammzellpopulation dar, deren Phänotyp dem des Myofibroblasten ähnelt (Direkze et al., 2003;Ebihara et al., 2006;Forbes et al., 2004). Zudem wird während der Entzündung und Wundheilung der Prozess der EMT beobachtet. In diesem Prozess sind epitheliale Zellen durch die Wirkung von TGF β 1, EGF und FGF in der Lage ihre Polarität und die Expression Epithel spezifischer Moleküle aufzugeben und ihren Phänotyp zum Myofibroblasten zu verändern (Kalluri and Neilson, 2003). Da diese Prozesse aber auch entzündungsgesteuert ablaufen und in NGF-Tg Mäusen diese nicht vorlag, könnte dies eine Erklärung für die im Vergleich geringere Kollagenmenge in den Atemwegen liefern.

Ein weiterer Grund für die, entgegen der Erwartung, geringere Kollagenmenge in NGF-Tg Mäusen könnte im Zusammenspiel des NGF- Rezeptorsystems liegen. Wie viele

biologische Systeme kann auch das NGF-System seine eigene Wirkung regulieren. Eine Möglichkeit hierzu bietet der p75^{NTR}. Er kann über die Wirkung von Sekretasen extrazellulär gespalten werden. Als lösliches Fragment freigesetzt, kann er als *scavenger*-Rezeptor agieren und freigesetztes NGF binden (Chao, 2003). Das so gebundene NGF wäre dann nicht mehr in der Lage an membrangebundene Rezeptoren zu binden und Zielzellen zu aktivieren. Ob dies für die NGF-Tg Maus zutrifft, könnte allerdings nur durch weitere Experimente belegt werden.

In einem weiteren Ansatz wurde überprüft, ob stark erhöhte NGF-Spiegel während der chronisch allergischen Atemwegsentszündung die bronchiale Kollagenablagerung weiter steigern können. Hierfür wurden NGF-Tg Mäuse dem OVA Protokoll unterzogen. Der Vergleich der Kollagenschichtdicke in OVA behandelten WT- und NGF-Tg- Mäusen zeigte, entgegen der Erwartung, keine stärkere Kollagenablagerung in NGF-Tg/OVA Mäusen. Eigene Daten, welche in einer Kinetik dieses Mausmodells in WT-Mäusen über einen Zeitraum von 12-Wochen erhoben wurden, zeigten, trotz weiterer Allergenprovokation, keine weitere Zunahme in der bronchialen Kollagenmenge (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse belegen, dass, durch die Allergenprovokation über einen Zeitraum von 4 Wochen, ein Maximum der Kollagenablagerung erreicht wurde und deuten auch auf eine mögliche Limitation des Mausmodells hin.

Die Verdickung der Atemwegswand in NGF-Tg Mäusen ist zwar sehr prominent, bisher aber kaum untersucht. In den Atemwegen dieser Mäuse konnte eine Zunahme an der Dichte sensorischer und sympathischer Neurone durch die NGF- Überexpression gezeigt werden (Hoyle et al., 1998). Jedoch deuten die Nuklei um die Atemwege im histologischen Präparat auf eine residente Zellpopulation hin. In Frage kämen neben Fibroblasten auch glatte Muskelzellen der Atemwege, welche TrkA exprimieren und auf NGF Stimulus hin *in vitro* proliferieren (Freund-Michel et al., 2006). Hier zeigte eine immunhistochemische Färbung für α -SMA keine Unterschiede zwischen WT- und NGF-Tg Mäusen (Daten nicht gezeigt). Dies kann auf die Auswahl des Markers zurückgeführt werden, welcher keinen Muskelzell spezifischen darstellt. α -SMA wird zwar in der Literatur als gängiger Marker für glatte Muskelzellen eingesetzt, wird aber auch von Myofibroblasten exprimiert (Tomasek et al., 2002). Um dies zu klären, könnte eine Färbung für die *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) durchgeführt werden.

Bei der näheren Betrachtung der Zellmorphologie wirken die Zellen unterhalb des Epithels durch ihr vergrößertes Zytoplasma hypertroph. Dies kann entweder durch die

erhöhte NGF-Expression oder das veränderte Mikromilieu bedingt sein. Im Konzept der *epithelial mesenchymal trophic unit* (EMTU) wird den strukturellen Komponenten selbst eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der morphologischen Veränderungen zugeschrieben. Plopper et al. postulieren, dass Strukturzellen der Atemwege, wie Fibroblasten, während Prozessen wie der Wundheilung und entzündlichen Reaktionen das Mikromilieu durch die Produktion der EZM und entzündlicher Mediatoren kontrollieren. Die sezernierten Matrix-Komponenten beeinflussen neben dem lokalen Milieu, das Verhalten der Zellen (2007). Kollagene könnten in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Sie gewährleisten nicht nur mechanische Festigkeit, sondern stellen auch Signalmoleküle dar, welche die Zellform und das Zellverhalten definieren. Die Kommunikation zwischen Kollagenmolekülen und Zellen geschieht über Oberflächenrezeptoren. Zu diesen gehören Integrine und *discoidin domain receptors* (DDR). DDRs stellen eine Unterfamilie der Rezeptor- Tyrosin- Kinasen dar, deren Aktivierung neben der Zell- Proliferation, Migration und Motilität die Expression und Aktivität von Metalloproteasen (MMP-1) beeinflusst (Vogel et al., 1997). Integrine bestehen aus einer α - und β - Untereinheit, welche extrazellulär über Calcium-Ionen verbunden sind (Plow et al., 2000). Über die Erkennung der entsprechenden Bindungssequenz in Matrixproteinen, die bekannteste ist das Triplet RGD (Arginin-Glycin- Aspartat), vermitteln sie vor allem die Zellbindung (Morton et al., 1994;Staatz et al., 1991). Sie leiten über Zell-Zell- und Zell-Matrix Verknüpfungen Signale in das Zellinnere, welche zur Einleitung der Apoptose, dem Überleben, der Proliferation und Migration der Zellen führen können (Frisch and Ruoslahti, 1997;Stupack and Cheresch, 2002). Die Integrin abhängige Adhäsion von Zellen an EZM-Proteine kann das Überleben der Zellen fördern, während ein Kontaktverlust an EZM-Komponenten oder Bindung an degradierte Matrix-Proteine zur Induktion der Apoptose und Umorganisation des Zytoskeletts führen können (Hood and Cheresch, 2002;Liddington and Ginsberg, 2002). Im Zuge der Wundheilung wird Kollagen durch MMPs gepalten und sehr schnell denaturiert. Dadurch verliert das Integrin seine Affinität zum Kollagen, wodurch die intrazellulären *focal adhesion kinases* (FAK) disassemblieren und die Umorganisation des Zytoskeletts, über kleine Rho-GTPasen wie Rac (Burrige and Wennerberg, 2004), einleiten. Dadurch wird eine Bewegung der Zellen initiiert, welche dann erneut Zell-Matrix-Interaktionen eingehen können. Es könnte also, durch das vermehrt abgelagerte Kollagen in NGF-Tg Atemwegen nicht zum Kontaktverlust der Zellen mit der Matrix gekommen sein, wodurch das Zytoskelett nicht umorganisiert wurde. Als Folge könnte dieses hypertrophe Erscheinungsbild dieser Zellen resultiert sein. Ein solcher Mechanismus wird für die Entstehung der Muskelzell-Hypertrophie in chronisch entzündeten Atemwegen im Asthma bronchiale diskutiert. Die histologischen

Präparate der NGF-Tg Maus deuten auf eine Rolle von NGF in einem solchen Prozess hin. Dies ist allerdings rein hypothetisch und kann nur durch Experimente belegt werden.

Zusammenfassend lässt sich dennoch sagen, dass die alleinige Überexpression von NGF, in Abwesenheit einer lokalen Entzündungsreaktion, bereits zu einer morphologischen Veränderung der Atemwegswand und zur deutlichen Zunahme der Kollagenablagerung im Lungengewebe führte.

Strukturelle Veränderungen in NGF-Tg Mäusen beeinträchtigen die Lungenphysiologie

Als klinische Merkmale des Asthma bronchiale können periodisch auftretende Atemwegsobstruktionen und eine gesteigerte Atemweghyperreagibilität (AHR) beobachtet werden. Die gesteigerte Kontraktilität der Atemwegsmuskulatur, die Überempfindlichkeit auf diverse Stimuli und strukturelle Veränderungen werden auf die chronische Entzündung in den Atemwegen zurückgeführt. Entzündliche Mediatoren, die von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in dem Gewebe freigesetzt werden sowie neuronale Reflexe werden als Auslöser dieser Überempfindlichkeit eingestuft. In Asthmatikern kann jedoch mit zunehmendem Alter eine persistierende Atemwegsobstruktion beobachtet werden, die vor allem mit der Dauer und dem Schweregrad der Erkrankung sowie dem Ausmaß des *airway remodeling* in Korrelation steht (Bai et al., 2000; Bumbacea et al., 2004; Mascia et al., 2005). Als Konsequenz dieser Obstruktion kann eine Verringerung der Einsekundenkapazität (FEV1) beziehungsweise einer Erhöhung des Atemwegwiderstandes beobachtet werden. In der chronisch allergisch entzündeten Lunge führen die erhöhte Mukusproduktion, der Einstrom von Leukozyten, entzündungsbegleitende Ödeme, die subepitheliale Fibrose und die dickere Muskelzellschicht zur Verdickung der Atemwegswand. Der Befund, dass in vielen Patienten trotz anti-entzündlicher Therapie die Atemwegsobstruktion nicht aufzulösen war (Djukanovic et al., 2004; Leckie et al., 2000), führte zu der Vermutung strukturelle Veränderungen könnten maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sein. Die Präsenz dieser Veränderungen in den Atemwegen asthmatischer Patienten, reichen vom frühkindlichen Asthma (Barbato et al., 2006; Cokugras et al., 2001; Fedorov et al., 2005) über unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung (Bai et al., 2000; Elias et al., 1999; Pepe et al., 2005). Als Bestandteile des *remodeling* treten die subepitheliale Fibrose und eine Zunahme der glatten Muskelzellschicht auf. Über lange Zeit wurden sie als Resultat der wiederkehrenden chronischen Entzündung

betrachtet. Jedoch der Nachweis des *remodelings* in Atemwegen jugendlicher Asthmatiker (Cokugras et al., 2001; Pohunek et al., 2005), ohne klinische Manifestation, ließ vermuten, dass sich die strukturellen Veränderungen nicht als Resultat der Entzündung ausbilden, sondern in einer gestörten epithelialen Integrität begründet sein könnten (Holgate, 2007). Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis der gesteigerten Anfälligkeit des asthmatischen Atemwegepithels für Verletzungen gekoppelt mit einer defizienten Immunabwehr (Bucchieri et al., 2002; Wark et al., 2005) und anormalen Reparaturmechanismen in diesem (Puddicombe et al., 2003; Stevens et al., 2008). Als Folge dieser gestörten Interaktion, wird durch epitheliale Faktoren die subepitheliale Fibrose vermittelt. Obwohl die genauen Mechanismen für die Entstehung der persistenten Atemwegsobstruktion noch nicht aufgeklärt sind, scheint es einen Konsens zu geben, dass alle Parameter, die zu einer Verengung des Atemweglumens führen können, an diesem Phänomen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang könnte NGF eine bedeutende Rolle spielen. Die in Tg-Mäusen erfolgte Überexpression in Epithelzellen der Atemwege führte in Unabhängigkeit einer lokalen Entzündungsreaktion zur Erhöhung des Atemwegwiderstandes in naiven Tieren. Diese ging sehr wahrscheinlich auf die verdickten Atemwege im proximalen und vor allem im distalen Kompartiment der Lunge zurück. Da in NGF-Tg Mäusen weder eine Becherzellmetaplasie (Daten nicht gezeigt) noch eine Entzündung vorlagen und die Versuchstiere keinem Bronchokonstriktor, wie Acetylcholin-Derivaten, ausgesetzt waren, ist die erhöhte *resistance* auf die strukturellen Veränderungen zurückzuführen. Neben der erhöhten *resistance* war in NGF-Tg Mäusen auch eine niedrigere *compliance* zu beobachten. Die *compliance* dient als Maß der Dehnbarkeit der Lunge. Sie wird maßgeblich durch die Menge und Anordnung kollagener und elastischer Fasern bestimmt. Kollagene bestimmen die maximale Expansion der Lunge. Elastische Fasern gewährleisten die nötige Elastizität, die für den Rückgang der Lunge in die Ausgangsform nach Inspiration benötigt wird (Davidson, 1990; Mascia et al., 2005). Asthmatische Atemwege weisen eine verstärkte aber auch veränderte Matrix auf (Brewster et al., 1990). Die Verdickung der L. reticularis geht auf die vermehrt produzierten Kollagene (Roche et al., 1989), sowie Tenascin und Fibronectin zurück. Während eine Verdickung der Atemwegswand unumstritten mit der Atemwegshyperreagibilität assoziiert wird, wird den verstärkt abgelagerten Kollagenen eine protektive Rolle zugeschrieben (Niimi et al., 2003). So können Kollagenfasern die Atemwege vor dem Kollaps schützen, indem sie der glatten Muskulatur ein Gegengewicht bieten. Gleichzeitig tragen sie aber auch durch ihre Zugfestigkeit zur Steifigkeit des Gewebes bei. Im Asthma bronchiale kann diese exzessive abgelagerte Matrix als Teil des *airway remodeling* zur Versteifung der Atemwege und einer

herabgesetzten Dehnbarkeit der Atemwegswände führen (Wilson et al., 1993). Basierend auf den mechanischen Eigenschaften der Kollagene, könnte das verdickte Kollagenband um die Atemwege NGF-Tg Mäuse zur beobachteten niedrigeren *compliance* geführt haben. Nicht auszuschließen ist allerdings auch, dass die Kollagenablagerung nicht nur auf die Atemwege begrenzt war, sondern auch im alveolären Kompartiment stattfand und zu einer Versteifung der alveolären Wände beigetragen hat (Gross and Hunninghake, 2001). Ein solches Konzept ist auch für die humane Situation denkbar. Die epitheliale Integrität kann entweder durch Infekte oder genetisch bedingt gestört sein. Da NGF vor allem vom aktivierten Epithel in den Atemwegen freigesetzt wird (Olgart et al., 2002; Othumpangat et al., 2009), könnte NGF über die Vermittlung struktureller Veränderungen zur Beeinträchtigung der Lungenfunktion beitragen.

NGF induziert die Kollagen III Expression in Lungenfibroblasten über die Aktivierung der p38 MAPK

Über die Wirkung von NGF auf die Induktion der Kollagenexpression ist auf zellulärer Ebene sehr wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von NGF auf die Expression des Kollagen III- Moleküls in Lungenfibroblasten untersucht. Kollagene können von Fibroblasten, Myofibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert werden. Fibroblasten stellen mit einer Synthesekapazität von bis zu 5000 Kollagenmolekülen pro Zelle pro Minute (Lindahl et al., 2002) eine hoch potente Population dar. Die Wahl des zu untersuchenden Kollagens fiel auf Kollagen III, da es während der Wundheilung verstärkt exprimiert wird. Das Kollagen III verleiht der provisorischen Matrix während der initialen Wundheilung Flexibilität. Es ist aber auch instabiler als Kollagen-I und kann leichter abgebaut werden. Während der Wundheilung überwiegt zunächst die Expression des Kollagen- III (Robins et al., 2003). Im Zuge der Wundheilung wird die Matrix umgebaut („*remodeling*“), bei dem das instabile Kollagen III sukzessive abgebaut wird und in Maßen durch Kollagen I ersetzt wird (Scharffetter et al., 1989). Dieses verleiht dem Gewebe wieder mechanische Zugfestigkeit. Da ein chronisch entzündetes Gewebe, bei dem die Reparaturmechanismen wiederholt eingeleitet werden, den Ausgangspunkt der epithelialen Integrität nicht mehr erreicht, wird vermehrt das instabile Kollagen III abgelagert und kann, z.B. in der Dermis, bis zu 70 % des Kollagenanteils ausmachen (Robins et al., 2003).

Zur Wirkung von NGF auf die Kollagen III Expression konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch exogene Gabe von NGF die Kollagen III Expression in Lungenfibroblasten aus der Maus induziert wurde. Die Expression beruhte auf der direkten Induktion der Kollagen III Transkription. NGF vermittelte diesen Effekt über die Aktivierung des Rezeptors TrkA und intrazellulär über die p38 MAPK.

Die wenigen Erkenntnisse zur Beteiligung von NGF an der Kollagenexpression stammen entweder aus *in vivo* Experimenten oder vereinzelt aus *in vitro* Experimenten, welche an isolierten pulmonalen oder dermalen Fibroblasten durchgeführt wurden. So konnten Nithya et al. in Ihrer Arbeit zeigen, dass die topische Applikation von NGF durch die Induktion der Kollagen I- Expression die dermale Wundheilung förderte (Nithya et al., 2003). Hierbei handelt es sich allerdings um *in vivo* Langzeitexperimente, welche eine indirekte Beteiligung weiterer Faktoren nicht ausschließen kann. Im Gegensatz hierzu zeigten Micera et. al. an isolierten pulmonalen Fibroblasten, dass NGF die Kollagenexpression nicht beeinflusste, aber die Differenzierung zum Myofibroblasten förderte (2001a). In den Experimenten dieser hier vorliegenden Arbeit wurden Fibroblasten aus der Mauslunge isoliert und nur in den Passagen 2-4, bis zu ihrer phänotypischen Veränderung, eingesetzt. Nach Verlust ihres spindelförmigen Phänotyps wurden diese Zellen als verändert eingestuft. Die Untersuchung der Kollagenexpression wurde auf mRNA Ebene, beziehungsweise die Aktivierung des $\text{col3}(\alpha 1)$ -Promotors mittels Promotor- Reporterkonstrukten nach einem Stimulationszeitraum von 8 h mit NGF bestimmt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Induktion der Kollagen III Expression durch NGF.

Die Bestimmung der Kollagen- Proteinmenge wurde nicht durchgeführt. Zur Untersuchung NGF vermittelter Effekte ist die Kultivierung der Zellen unter Serum reduzierten Bedingungen notwendig, da in fötalem Kälberserum als Zellkulturzusatz das pro-fibrotische TGF β 1 in sehr hohen Mengen vorliegt. In eigenen Vorversuchen zeigte sich, dass primäre Fibroblasten eine solche Kulturbedingung für maximal 24h tolerierten, bevor viele der Zellen apoptotisch wurden (Daten nicht gezeigt). Da für die Detektion von Proteinen Zeiträume von 24-72h eingehalten werden müssen, wären noch vor Ablauf des Versuchszeitraums die Großzahl der Zellen durch Apoptose eliminiert worden. Zudem sollten durch Kurzzeitexperimente und Serum reduzierten Bedingungen ausgeschlossen werden, dass durch die Langzeitkultivierung und Stimulation der Zellen indirekte Effekte auftraten. So hätten, durch die Induktion weiterer Faktoren durch NGF, diese in die Ergebnisse mit einfließen und falsche Erkenntnisse liefern können.

Es ist allerdings davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Fibroblasten keine reine Kultur darstellen. Im Unterschied zu Immunzellen gibt es für

mesenchymale Zellen, vor allem aus der Maus, keine spezifischen Oberflächenmarker, welche die Isolation einer reinen Zellpopulation erlauben würden. Die gängige Methode der Gewebdissoziation durch Kollagenasen führt zunächst zur Kultivierung einer Mischpopulation an Strukturzellen. Über die Zeit würden Epithelzellen, welche für die Ausbildung ihrer Polarität definierte Kulturbedingungen benötigen, aus der Kultur entweder durch Apoptose oder Dedifferenzierung eliminiert. Für glatte Muskelzellen, als Beispiel, konnte eine Phänotyp-Veränderung in Kultur allein durch die Präsenz des FCS im Medium gezeigt werden. So behalten glatte Muskelzellen ihren kontraktilen Apparat unter niedrigen (5 %) FCS-Konzentrationen bei, während die Kultivierung mit hohen (10 %) FCS-Konzentrationen, welche der gängigen Bedingung entspricht, die Ausbildung eines synthetischen Phänotyps begünstigt (Zuyderduyn et al., 2008). Auch bei Fibroblasten führt die Kultivierung mit hohen TGF β 1-Konzentrationen zu einem Phänotyp-Switch zum Myofibroblasten (Hecker et al., 2009; Tsapara et al., 2010). Obwohl der Literatur folgend die isolierten Zellen auf die Präsenz „Fibroblasten spezifischer“ Gene, wie Kollagen-III und Vimentin getestet wurden, ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit verwendete Fibroblasten-Population aus der Mauslunge nicht als reine Fibroblasten-Kultur betrachtet werden kann. Dieser Umstand könnte jedoch die variierenden col3(α 1)- mRNA Expressionsdaten in dieser Arbeit erklären.

Die Kollageninduktion wurde vor allem für das pro-fibrotische TGF β 1 und die Aktivierung seiner intrazellulären SMAD-Signalkaskade beschrieben. Neben diesem Signalweg, werden seit einiger Zeit auch die Stress-aktivierten MAPK ERK1/2 (Hayashida et al., 2003), die JNK (Alcorn et al., 2009) und die p38 MAPK (Rodriguez-Barbero et al., 2002) als Signalwege zur Kollageninduktion beschrieben. Während der SMAD-Signalweg direkt nur durch die TGF β -Familie aktiviert werden kann, spielen die MAPK in vielen unterschiedlichen Signalwegen eine wichtige Rolle und können durch unterschiedliche Liganden und Rezeptoren aktiviert werden. NGF kann diese drei MAPK über zwei unterschiedliche Rezeptorsysteme aktivieren, so werden über TrkA die ERK1/2 und p38 MAPK und über p75^{NTR} die JNK aktiviert (Chao, 2003). Da die Untersuchung des JNK-Signalwegs die Beteiligung des gesamten p75^{NTR}-Rezeptorsystems erklären konnte, wurden p75^{NTR}^{-/-} Mäuse untersucht. Dies schien notwendig, da entgegen der publizierten Daten die isolierten Lungenfibroblasten nicht nur TrkA sondern auch ohne NGF-Exposition p75^{NTR} exprimierten (Micera et al., 2001a). Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Experimente an Lungenfibroblasten zeigten, dass auch ohne die Aktivierung der p75^{NTR}-Signalwege NGF die Kollagen III Expression induzieren konnte.

Die Induktion der Kollagen III Expression durch NGF/TrkA wurde sowohl durch Untersuchungen an Promotor- Reporterkonstrukten als auch durch siRNA *knock down* Experimente gezeigt. So konnte beobachtet werden, dass durch die Expression eines funktionellen TrkA Rezeptors die Kollagen III- Transkription erfolgte, während diese bei der Expression der inaktiven TrkA Mutante unterblieb. In Lungenfibroblasten konnte umgekehrt nach dem *knock down* des TrkA- Rezeptors mittel siRNA keine col3(α 1) mRNA auf NGF- Stimulus hin induziert werden. Hieraus wurde geschlossen, dass das Signal entweder über ERK1/2 oder p38 MAPK geleitet wurde. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnte sowohl an Lungenfibroblasten aus der Maus als auch Promotor- Reporterkonstrukten gezeigt werden, dass im Falle für NGF der p38 MAPK zur Kollageninduktion genutzt wird.

Zu untersuchen bliebe über welche Isoform der vier p38 MAPK (α , β , γ oder δ) NGF die Kollagenexpression induziert. Einen Hinweis darauf liefert der verwendete *small molecule inhibitor* SB202190. Dieser gehört gemeinsam mit dem in der Literatur breit eingesetzten SB203580 zu den *cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs* (CSAIDs). Für diese beiden Inhibitoren wurde die selektive Inhibierung der p38 α und p38 β - Isoformen gezeigt (Lee et al., 1994).

Bei der Untersuchung der Promotoraktivierung durch NGF mittels Luc- Reporterplasmiden zeigte sich, dass sich kurz vor dem TK-Startpunkt (+1) in einem Bereich bis ca. -120 bp im col3(α 1)- Promotor Bindestellen für TK-Faktoren befinden, die durch TrkA/p38 MAPK signalling aktiviert werden können. Dies wurde deutlich, da bei der Kürzung des zu untersuchenden Promotorbereichs von -1000 bp bis auf -120 bp eine deutlichen Steigerung des Luc- Signals bewirkte. Somit war zu folgern, dass sich weiter distal auch Bindestellen für TK-supprimierende Faktoren befinden (Mudryj and de Crombrughe, 1988). Eine durchgeführte *in silico* Analyse für Transkriptionsfaktor- Bindestellen im untersuchten kürzesten Promotorbereich des col3(α 1)-Gens zeigte (Daten nicht gezeigt), dass sich hier Bindemotive für Zielproteine der p38 MAPK finden. Hierzu gehört der *activating transcription factor 2* (ATF2) (Daian et al., 2003), welcher mit der Kollagenexpression in Verbindung gebracht wird.

NGF induziert die Kollagen III Expression in Unabhängigkeit von TGF β 1

Die Fibrosierung eines Gewebes geht mit der erhöhten Proliferation von Fibroblasten und der erhöhten Produktion von Kollagenen einher. Als Hauptkandidat für diese profibrotische Aktivitäten gilt TGF β 1. In unterschiedlichen chronisch entzündlichen Erkrankungen der Atemwege, wie dem Asthma bronchiale, kann TGF β 1 in erhöhten

Konzentrationen nachgewiesen werden (Minshall et. al., 1997; Vignola et. al. 1997). Dies gilt ebenfalls für das Tiermodelle der genannten Erkrankung (Wegmann et. al. 2005). Als Hauptsignalweg für TGF β 1 wird die SMAD-Kaskade für fibrotische Ereignisse aktiviert. Durch die Dimerisierung der T β RII- und T β RI- Ketten werden die Rezeptor- ständigen SMAD- Proteine aktiviert und translozieren nach ihrer Bindung an SMAD4 in den Kern und induzieren die Expression pro-fibrotischer Gene. So sind für Fibroblasten die verstärkte Expression von Kollagenen, die Proliferation, die Migration und Differenzierung zu Myofibroblasten durch TGF β 1/SMAD beschrieben (Eickelberg, 2001; Rahimi and Leof, 2007). Neben diesem Signalweg konnte auch für MAPK die Induktion pro-fibrotischer Gene gezeigt werden (Hayashida et al., 2003; Alcorn et al., 2009; Rodriguez-Barbero et al., 2002). Für die ERK1/2 wurde eine Konvergenz in den SMAD-Signalweg beschrieben (Hayashida et al. 2003). Durch eine Phosphorylierung der SMAD2- und SMAD3- Proteine, wird deren Aktivierung, Oligomerisierung mit SMAD4 und Translokation in den Kern verstärkt. Somit würden die MAPK keinen eigenständigen Signalweg darstellen sondern in den TGF β 1- Signalweg münden. Eine weitere Publikation implementiert aber auch für TGF β 1, über die *tgf- activated kinase 1*, eine Verbindung zu und Aktivierung der p38 MAPK zur Kollagensynthese (Kim SI et. al. 2007). Für NGF ist die Aktivierung von SMAD4 in PC12-Zellen (Lutz et al., 2004) und die Induktion der TGF β 1-Expression *in vitro* (Micera et al., 2005) beschrieben. Sowohl die *in vitro* als auch *in vivo* Beobachtungen zeigten eine Unabhängigkeit des NGF vermittelten Kollageninduktion. Die NGF vermittelte Kollagenexpression war *in vitro* durch *knock down* des TGF β 1/SMAD Signalweges nicht beeinträchtigt. Auch war in NGF-Tg Mäusen keine veränderten TGF β 1-Spiegel zu beobachten. Somit war zu folgern, dass NGF die Kollagen III Expression weder durch die Induktion des pro-fibrotischen Zytokins TGF β 1 vermittelt, noch die aktivierte p38 MAPK in den SMAD-Signalweg mündet.

5. SUMMARY

Excessive extra cellular matrix deposition is a disease limiting process in various chronic inflammatory diseases and is associated with loss of organ function. In bronchial asthma exaggerated matrix deposition leads to subepithelial fibrosis in the airways and contributes to lung function decline in the progression of the disease. This fibrotic response is thought to result from repetitive injury-repair cycles upon tissue damage and is considered as imperfect wound healing. Growth factors, which are secreted by damaged epithelial cells and inflammatory cells upon allergen provocation, orchestrate the subsequent repair process at wound sites. In chronic inflammatory conditions the augmented expression of these factors is found to drive this pathological process. During allergic airway inflammation Nerve Growth Factor (NGF) levels are elevated. The identification of the airway epithelium as a major cellular source for NGF and the documented wound healing properties of this molecule in airway epithelial cells and lung fibroblasts, led to the hypothesis that NGF contributes to deregulated repair-processes in the chronic allergic inflamed lung. To investigate this, mouse models of acute and chronic allergic airway inflammation were utilized, where structural changes were seen to be accompanied by augmented NGF levels. Functional blocking of NGF in experimental chronic asthma markedly prevented subepithelial fibrosis. Conversely, transgenic over-expression of NGF in murine airways (NGF-Tg) was seen to alter airway wall morphology and lung physiology. Peribronchial collagen deposition in NGF-Tg mice developed in the absence of an inflammatory response and unaltered transforming growth factor (TGF) β 1 levels. Studies, aiming the delineation of the NGF receptor and signalling pathway important for collagen production, were conducted. *In vivo* and *in vitro* data clearly demonstrated the importance of the NGF receptor tropomyosin related kinase (Trk) A and not p75^{NTR} in collagen expression. Furthermore, NGF/TrkA signalling was seen to involve p38 MAPK independent of the TGF β 1/mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) pathway. These data demonstrate for the first time the pro-fibrotic activity of NGF in chronic allergic airway inflammation and provide evidence for a novel pathway for collagen deposition, which relies on NGF and TrkA signalling.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Gewebsfibrosierung, als ein Charakteristikum vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen, wird mit der Beeinträchtigung der Organfunktion assoziiert. Sie wird als unvollständiger Reparaturversuch des Gewebes auf einen chronischen Entzündungsreiz verstanden. Beim allergischen Asthma manifestiert sich diese Fibrose im subepithelialen Bereich der Atemwege und trägt zur Verschlechterung der Lungenfunktion über die Progression der Erkrankung bei. Wachstumsfaktoren, die auf einen Entzündungsreiz hin von verletzten Epithel- und Entzündungszellen freigesetzt werden, dirigieren den sich anschließenden Reparaturversuch des Gewebes. Eine gesteigerte Expression dieser Faktoren im chronisch entzündeten Gewebe gilt als Ursache dieser Fibrosierung. Während der allergischen Atemwegsentzündung wird *Nerve Growth Factor* (NGF) sowohl vom Epithel als auch von Entzündungszellen in erhöhten Mengen produziert. Die dokumentierten wundheilungsfördernden Eigenschaften von NGF führten zu der Hypothese, dass NGF an der deregulierten Wundheilung beteiligt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Rolle von NGF bei Fibrosierungsprozessen in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung aufgezeigt werden. In Modellen der akuten und chronisch allergischen Atemwegsentzündung konnten, die strukturellen Veränderungen begleitend, erhöhte NGF-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Neutralisierung von NGF im Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung der Maus blockierte die Bildung der subepithelialen Fibrose. In einem umgekehrten Ansatz konnten durch die selektive Überexpression von NGF in Atemwegsepithelien (NGF-Tg) strukturelle Veränderungen in den Atemwegen, die sich auf die Lungenphysiologie auswirkten, beobachtet werden. Die peribronchiale Fibrose in den Atemwegen NGF-Tg Mäuse bildete sich in Unabhängigkeit von einer lokalen Entzündung und unveränderten *Transforming Growth Factor* (TGF) β 1-Konzentrationen aus. Sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Experimente zeigten, dass NGF diesen Effekt über die Aktivierung des Rezeptors *tropomyosin related kinase* (Trk) A und nicht p75^{NTR} vermittelte. Der identifizierte TGF β 1/mothers against decapentaplegic homolog (SMAD) unabhängige Signalweg über TrkA und p38 MAPK belegt die pro-fibrotische Aktivität von NGF. Damit konnte ein neuer Mechanismus zur Kollageninduktion, welcher auf der Aktivierung des NGF/TrkA Signalwegs beruht, identifiziert werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Alcorn, J.F., d.van, V, A.L.Brown, B.McElhinney, C.G.Irvin, and Y.M.Janssen-Heininger. 2009. c-Jun N-terminal kinase 1 is required for the development of pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40:422-432.

Aszodi, A., A.Pfeifer, M.Wendel, L.Hiripi, and R.Fassler. 1998. Mouse models for extracellular matrix diseases. *J Mol Med* 76:238-252.

Aumailley, M. and B.Gayraud. 1998. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76:253-265.

Bai, T.R. 2010. Evidence for airway remodeling in chronic asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 10:82-86.

Bai, T.R., J.Cooper, T.Koelmeyer, P.D.Pare, and T.D.Weir. 2000. The effect of age and duration of disease on airway structure in fatal asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 162:663-669.

Barbato, A., G.Turato, S.Baraldo, E.Bazzan, F.Calabrese, C.Panizzolo, M.E.Zanin, R.Zuin, P.Maestrelli, L.M.Fabbri, and M.Saetta. 2006. Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 174:975-981.

Barnes, P.J. 2010. Medicine. Neutrophils find smoke attractive. *Science* 330:40-41.

Bayas, A., N.Kruse, N.F.Moriabadi, F.Weber, V.Hummel, G.Wohleben, R.Gold, K.V.Toyka, and P.Rieckmann. 2003. Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells. *Neurosci. Lett.* 335:155-158.

Benayoun, L., A.Druilhe, M.C.Dombret, M.Aubier, and M.Pretolani. 2003. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 167:1360-1368.

Bernabei, R., F.Landi, S.Bonini, G.Onder, A.Lambiase, R.Pola, and L.Aloe. 1999. Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers. *Lancet* 354:307.

Bleecker, E.R. 2004. Similarities and differences in asthma and COPD. The Dutch hypothesis. *Chest* 126:93S-95S.

Bonini, S., A.Lambiase, S.Bonini, F.Angelucci, L.Magrini, L.Manni, and L.Aloe. 1996. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 93:10955-10960.

Bonini, S., A.Lambiase, P.Rama, G.Caprioglio, and L.Aloe. 2000. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 107:1347-1351.

Bousquet, J., P.K.Jeffery, W.W.Busse, M.Johnson, and A.M.Vignola. 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1720-1745.

Braun, A., E.Appel, R.Baruch, U.Herz, V.Botchkarev, R.Paus, C.Brodie, and H.Renz. 1998. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur. J Immunol* 28:3240-3251.

- Brewster, C.E., P.H.Howarth, R.Djukanovic, J.Wilson, S.T.Holgate, and W.R.Roche. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 3:507-511.
- Brodie, C. and E.W.Gelfand. 1992. Functional nerve growth factor receptors on human B lymphocytes. Interaction with IL-2. *J Immunol* 148:3492-3497.
- Bruckner, S.R., S.P.Tammariello, C.Y.Kuan, R.A.Flavell, P.Rakic, and S.Estus. 2001. JNK3 contributes to c-Jun activation and apoptosis but not oxidative stress in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurochem.* 78:298-303.
- Bucala, R., L.A.Spiegel, J.Chesney, M.Hogan, and A.Cerami. 1994. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81.
- Bucchieri, F., S.M.Puddicombe, J.L.Lordan, A.Richter, D.Buchanan, S.J.Wilson, J.Ward, G.Zummo, P.H.Howarth, R.Djukanovic, S.T.Holgate, and D.E.Davies. 2002. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:179-185.
- Bumbacea, D., D.Campbell, L.Nguyen, D.Carr, P.J.Barnes, D.Robinson, and K.F.Chung. 2004. Parameters associated with persistent airflow obstruction in chronic severe asthma. *Eur. Respir. J.* 24:122-128.
- Burridge, K. and K.Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116:167-179.
- Casaccia-Bonnet, P., B.D.Carter, R.T.Dobrowsky, and M.V.Chao. 1996. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383:716-719.
- Cassese, G., S.Arce, A.E.Hauser, K.Lehnert, B.Moewes, M.Mostarac, G.Muehlinghaus, M.Szyska, A.Radbruch, and R.A.Manz. 2003. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171:1684-1690.
- Chao, M.V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev Neurosci.* 4:299-309.
- Cohn, L., J.A.Elias, and G.L.Chupp. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu. Rev. Immunol.* 22:789-815.
- Cokugras, H., N.Akcakaya, Seckin, Y.Camcioglu, N.Sarimurat, and F.Aksoy. 2001. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 56:25-29.
- Cookson, W. and M.Moffatt. 2004. Making sense of asthma genes. *N. Engl. J Med* 351:1794-1796.
- Curran, D.R. and L.Cohn. 2010. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42:268-275.
- Dagnell, C., C.Kemi, J.Klominek, P.Eriksson, C.M.Skold, A.Eklund, J.Grunewald, and H.C.Olgart. 2007. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl. Res.* 150:303-310.

- Dagnell, C., J.Grunewald, M.Kramar, H.Haugom-Olsen, G.P.ElMBERGER, A.Eklund, and H.C.Olgart. 2010. Neurotrophins and neurotrophin receptors in pulmonary sarcoidosis - granulomas as a source of expression. *Respir. Res.* 11:156.
- Daian, T., A.Ohtsuru, T.Rogounovitch, H.Ishihara, A.Hirano, Y.kiyama-Uchida, V.Saenko, T.Fujii, and S.Yamashita. 2003. Insulin-like growth factor-I enhances transforming growth factor-beta-induced extracellular matrix protein production through the P38/activating transcription factor-2 signaling pathway in keloid fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 120:956-962.
- Davidson, J.M. 1990. Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur. Respir. J.* 3:1048-1063.
- de Vries, A., M.C.Dessing, F.Engels, P.A.Henricks, and F.P.Nijkamp. 1999. Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor- mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1541-1544.
- Di Marco, E., M.Mathor, S.Bondanza, N.Cutuli, P.C.Marchisio, R.Cancedda, and M.De Luca. 1993. Nerve growth factor binds to normal human keratinocytes through high and low affinity receptors and stimulates their growth by a novel autocrine loop. *J Biol. Chem* 268:22838-22846.
- Diegelmann, R.F. and M.C.Evans. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 9:283-289.
- Direkze, N.C., S.J.Forbes, M.Brittan, T.Hunt, R.Jeffery, S.L.Preston, R.Poulsom, K.Hodivala-Dilke, M.R.Alison, and N.A.Wright. 2003. Multiple organ engraftment by bone-marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone-marrow-transplanted mice. *Stem Cells* 21:514-520.
- Djukanovic, R., S.J.Wilson, M.Kraft, N.N.Jarjour, M.Steel, K.F.Chung, W.Bao, A.Fowler-Taylor, J.Matthews, W.W.Busse, S.T.Holgate, and J.V.Fahy. 2004. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 170:583-593.
- Ebadi, M., R.M.Bashir, M.L.Heidrick, F.M.Hamada, H.E.Refaey, A.Hamed, G.Helal, M.D.Baxi, D.R.Cerutis, and N.K.Lassi. 1997. Neurotrophins and their receptors in nerve injury and repair. *Neurochem. Int* 30:347-374.
- Ebihara, Y., M.Masuya, A.C.Larue, P.A.Fleming, R.P.Visconti, H.Minamiguchi, C.J.Drake, and M.Ogawa. 2006. Hematopoietic origins of fibroblasts: II. In vitro studies of fibroblasts, CFU-F, and fibrocytes. *Exp Hematol.* 34:219-229.
- Ehrhard, P.B., P.Erb, U.Graumann, and U.Otten. 1993. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 90:10984-10988.
- Ehrhard, P.B., P.Erb, U.Graumann, B.Schmutz, and U.Otten. 1994. Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T cell activation. *J. Immunol.* 152:2705-2709.
- Eickelberg, O. 2001. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis. *FEBS Lett.* 506:11-14.
- Elias, J.A., Z.Zhu, G.Chupp, and R.J.Homer. 1999. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 104:1001-1006.

- Fahy, J.V. 2009. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 6:256-259.
- Fedorov, I.A., S.J.Wilson, D.E.Davies, and S.T.Holgate. 2005. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax* 60:389-394.
- Fireman, P. 2003. Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* 24:79-83.
- Forbes, S.J., F.P.Russo, V.Rey, P.Burra, M.Rugge, N.A.Wright, and M.R.Alison. 2004. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 126:955-963.
- Freund-Michel, V., C.Bertrand, and N.Frossard. 2006. TrkA signalling pathways in human airway smooth muscle cell proliferation. *Cell Signal* 18:621-627.
- Friedman, S.L. 2004. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat. Clin Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 1:98-105.
- Frisch, S.M. and E.Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:701-706.
- Gabbiani, G. 1992. The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 41:530-532.
- Galli, S.J., M.Tsai, and A.M.Piliponsky. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
- Garcia-Suarez, O., M.A.Blanco-Gelaz, M.L.Lopez, A.Germana, R.Cabo, B.Diaz-Esnal, I.Silos-Santiago, E.Ciriaco, and J.A.Vega. 2002. Massive lymphocyte apoptosis in the thymus of functionally deficient TrkB mice. *J Neuroimmunol.* 129:25-34.
- Gelse, K., E.Poschl, and T.Aigner. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev* 55:1531-1546.
- Grol, M.H., J.Gerritsen, J.M.Vonk, J.P.Schouten, G.H.Koeter, B.Rijcken, and D.S.Postma. 1999. Risk factors for growth and decline of lung function in asthmatic individuals up to age 42 years. A 30-year follow-up study. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 160:1830-1837.
- Gross, T.J. and G.W.Hunninghake. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 345:517-525.
- Hahn, C., A.P.Islamian, H.Renz, and W.A.Nockher. 2006. Airway epithelial cells produce neurotrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117:787-794.
- Hart, J. 2002. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound. Care* 11:205-209.
- Hasan, W., R.Zhang, M.Liu, J.D.Warn, and P.G.Smith. 2000. Coordinate expression of NGF and alpha-smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. *Cell Tissue Res.* 300:97-109.
- Hayashida, T., M.Decaestecker, and H.W.Schnaper. 2003. Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF-beta-dependent responses in human mesangial cells. *FASEB J.* 17:1576-1578.

- Hecker, L., R.Vittal, T.Jones, R.Jagirdar, T.R.Luckhardt, J.C.Horowitz, S.Pennathur, F.J.Martinez, and V.J.Thannickal. 2009. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat. Med.* 15:1077-1081.
- Holgate, S.T. 2007. Epithelium dysfunction in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:1233-1244.
- Hood, J.D. and D.A.Cherness. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2:91-100.
- Hoyle, G.W., R.M.Graham, J.B.Finkelstein, K.P.Nguyen, D.Gozal, and M.Friedman. 1998. Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18:149-157.
- Jaworski, D.M. and L.Perez-Martinez. 2006. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression is regulated by multiple neural differentiation signals. *J. Neurochem.* 98:234-247.
- Jeffery, P.K. 1994. Comparative morphology of the airways in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 150:S6-13.
- Jeffery, P.K. 2001. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164:S28-S38.
- Jiang, Y., G.Chen, Y.Zhang, L.Lu, S.Liu, and X.Cao. 2007. Nerve growth factor promotes TLR4 signaling-induced maturation of human dendritic cells in vitro through inducible p75^{NTR} 1. *J. Immunol.* 179:6297-6304.
- Johnson, D., A.Lanahan, C.R.Buck, A.Sehgal, C.Morgan, E.Mercer, M.Bothwell, and M.Chao. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47:545-554.
- Kalluri, R. and E.G.Neilson. 2003. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112:1776-1784.
- Kanning, K.C., M.Hudson, P.S.Amieux, J.C.Wiley, M.Bothwell, and L.C.Schechterson. 2003. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci.* 23:5425-5436.
- Kawamoto, K. and H.Matsuda. 2004. Nerve growth factor and wound healing. *Prog. Brain Res.* 146:369-384.
- Kimata, H., A.Yoshida, C.Ishioka, T.Kusunoki, S.Hosoi, and H.Mikawa. 1991. Nerve growth factor specifically induces human IgG4 production. *Eur. J. Immunol.* 21:137-141.
- la Sala, A., S.Corinti, M.Federici, H.U.Saragovi, and G.Girolomoni. 2000. Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc. Biol.* 68:104-110.
- Lambiase, A., L.Bracci-Laudiero, S.Bonini, S.Bonini, G.Starace, M.M.D'Elios, M.De Carli, and L.Aloe. 1997. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. *J Allergy Clin Immunol* 100:408-414.
- Lambiase, A., L.Manni, S.Bonini, P.Rama, A.Micera, and L.Aloe. 2000. Nerve growth factor promotes corneal healing: structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 41:1063-1069.

Lambiase, A., P.Rama, S.Bonini, G.Caprioglio, and L.Aloe. 1998. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N. Engl. J Med* 338:1174-1180.

Lange, P., J.Parner, J.Vestbo, P.Schnohr, and G.Jensen. 1998. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N. Engl. J Med* 339:1194-1200.

Leask, A. and D.J.Abraham. 2003. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem. Cell Biol.* 81:355-363.

Leckie, M.J., B.A.ten, J.Khan, Z.Diamant, B.J.O'Connor, C.M.Walls, A.K.Mathur, H.C.Cowley, K.F.Chung, R.Djukanovic, T.T.Hansel, S.T.Holgate, P.J.Sterk, and P.J.Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148.

Lee, C.G., R.J.Homer, Z.Zhu, S.Lanone, X.Wang, V.Koteliansky, J.M.Shipley, P.Gotwals, P.Noble, Q.Chen, R.M.Senior, and J.A.Elias. 2001a. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* 194:809-821.

Lee, J.C., J.T.Laydon, P.C.McDonnell, T.F.Gallagher, S.Kumar, D.Green, D.McNulty, M.J.Blumenthal, J.R.Heys, S.W.Landvatter, and . 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372:739-746.

Lee, R., P.Kermani, K.K.Teng, and B.L.Hempstead. 2001b. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.

Lemanske, R.F., Jr., D.J.Jackson, R.E.Gangnon, M.D.Evans, Z.Li, P.A.Shult, C.J.Kirk, E.Reisdorf, K.A.Roberg, E.L.Anderson, K.T.Carlson-Dakes, K.J.Adler, S.Gilbertson-White, T.E.Pappas, D.F.Dasilva, C.J.Tisler, and J.E.Gern. 2005. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 116:571-577.

Lessmann, V., K.Gottmann, and M.Malcangio. 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69:341-374.

Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor 35 years later. *Science* 237:1154-1162.

Li, M.O., Y.Y.Wan, S.Sanjabi, A.K.Robertson, and R.A.Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev Immunol* 24:99-146.

Liddington, R.C. and M.H.Ginsberg. 2002. Integrin activation takes shape. *J. Cell Biol.* 158:833-839.

Lindahl, G.E., R.C.Chambers, J.Papakrivopoulou, S.J.Dawson, M.C.Jacobsen, J.E.Bishop, and G.J.Laurent. 2002. Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promoter. *J. Biol. Chem.* 277:6153-6161.

Liu, Y.J., H.Kanzler, V.Soumelis, and M.Gilliet. 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol* 2:585-589.

- Lohoff, M. and T.W.Mak. 2005. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 5:125-135.
- Lutz, M., K.Kriegelstein, S.Schmitt, D.P.ten, W.Sebold, A.Wizenmann, and P.Knaus. 2004. Nerve growth factor mediates activation of the Smad pathway in PC12 cells. *Eur. J. Biochem.* 271:920-931.
- Majno, G. 1979. The story of the myofibroblasts. *Am J Surg. Pathol.* 3:535-542.
- Maroder, M., D.Bellavia, D.Meco, M.Napolitano, A.Stigliano, E.Alesse, A.Vacca, G.Giannini, L.Frati, A.Gulino, and I.Screpanti. 1996. Expression of trkB neurotrophin receptor during T cell development. Role of brain derived neurotrophic factor in immature thymocyte survival. *J Immunol* 157:2864-2872.
- Martin-Zanca, D., R.Oskam, G.Mitra, T.Copeland, and M.Barbacid. 1989. Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene. *Mol Cell Biol.* 9:24-33.
- Mascia, K., T.Haselkorn, Y.M.Deniz, D.P.Miller, E.R.Bleecker, and L.Borish. 2005. Aspirin sensitivity and severity of asthma: evidence for irreversible airway obstruction in patients with severe or difficult-to-treat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:970-975.
- McDonald, B. and P.Kubes. 2010. Chemokines: sirens of neutrophil recruitment-but is it just one song? *Immunity.* 33:148-149.
- Micera, A., A.Lambiase, I.Puxeddu, L.Aloe, B.Stampachiacchiere, F.Levi-Schaffer, S.Bonini, and S.Bonini. 2006. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: possible mechanism during corneal healing. *Exp Eye Res.* 83:747-757.
- Micera, A., A.Lambiase, B.Stampachiacchiere, R.Sgrulletta, E.M.Normando, S.Bonini, and S.Bonini. 2007. Nerve growth factor has a modulatory role on human primary fibroblast cultures derived from vernal keratoconjunctivitis-affected conjunctiva. *Mol. Vis.* 13:981-987.
- Micera, A., I.Puxeddu, A.Lambiase, A.Antonelli, S.Bonini, S.Bonini, L.Aloe, J.Pe'er, and F.Levi-Schaffer. 2005. The pro-fibrogenic effect of nerve growth factor on conjunctival fibroblasts is mediated by transforming growth factor-beta. *Clin. Exp. Allergy* 35:650-656.
- Micera, A., E.Vigneti, D.Pickholtz, R.Reich, O.Pappo, S.Bonini, F.X.Maquart, L.Aloe, and F.Levi-Schaffer. 2001a. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 98:6162-6167.
- Micera, A., E.Vigneti, D.Pickholtz, R.Reich, O.Pappo, S.Bonini, F.X.Maquart, L.Aloe, and F.Levi-Schaffer. 2001b. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 98:6162-6167.
- Moore, B.B., J.E.Kolodsick, V.J.Thannickal, K.Cooke, T.A.Moore, C.Hogaboam, C.A.Wilke, and G.B.Toews. 2005. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol.* 166:675-684.
- Morton, L.F., A.R.Peachey, L.S.Zijenah, A.H.Goodall, M.J.Humphries, and M.J.Barnes. 1994. Conformation-dependent platelet adhesion to collagen involving integrin alpha 2 beta 1-mediated and other mechanisms: multiple alpha 2 beta 1-recognition sites in collagen type I. *Biochem. J* 299 (Pt 3):791-797.

- Mowla, S.J., H.F.Farhadi, S.Pareek, J.K.Atwal, S.J.Morris, N.G.Seidah, and R.A.Murphy. 2001. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol. Chem* 276:12660-12666.
- Mudryj, M. and B.de Crombrughe. 1988. Deletion analysis of the mouse alpha 1(III) collagen promoter. *Nucleic Acids Res.* 16:7513-7526.
- Myllyharju, J. and K.I.Kivirikko. 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20:33-43.
- Nassenstein, C., A.Braun, V.J.Erpenbeck, M.Lommatzsch, S.Schmidt, N.Krug, W.Luttmann, H.Renz, and J.C.Virchow, Jr. 2003b. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med* 198:455-467.
- Nassenstein, C., A.Braun, V.J.Erpenbeck, M.Lommatzsch, S.Schmidt, N.Krug, W.Luttmann, H.Renz, and J.C.Virchow, Jr. 2003a. The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. *J Exp Med* 198:455-467.
- Nials, A.T. and S.Uddin. 2008. Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge. *Dis. Model. Mech.* 1:213-220.
- Niimi, A., H.Matsumoto, M.Takemura, T.Ueda, K.Chin, and M.Mishima. 2003. Relationship of airway wall thickness to airway sensitivity and airway reactivity in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 168:983-988.
- Nithya, M., L.Suguna, and C.Rose. 2003. The effect of nerve growth factor on the early responses during the process of wound healing. *Biochim. Biophys. Acta* 1620:25-31.
- Olgart, H.C., F.de Blay, J.P.Oster, C.Duvernoille, O.Kassel, G.Pauli, and N.Frossard. 2002. Nerve growth factor levels and localisation in human asthmatic bronchi. *Eur. Respir J* 20:1110-1116.
- Othumpangat, S., L.F.Gibson, L.Samsell, and G.Piedimonte. 2009. NGF is an essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. *PLoS. One.* 4:e6444.
- Otten, U., P.Ehrhard, and R.Peck. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:10059-10063.
- Pardo, A. and M.Selman. 2006. Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling. *Proc. Am Thorac. Soc* 3:383-388.
- Pare, P.D., C.R.Roberts, T.R.Bai, and B.J.Wiggs. 1997. The functional consequences of airway remodeling in asthma. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 52:589-596.
- Park, M.J., H.J.Kwak, H.C.Lee, D.H.Yoo, I.C.Park, M.S.Kim, S.H.Lee, C.H.Rhee, and S.I.Hong. 2007. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and AP-2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* 282:30485-30496.
- Parsons, C.J., M.Takashima, and R.A.Rippe. 2007. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol. Hepatol.* 22 Suppl 1:S79-S84.

Path, G., A.Braun, N.Meents, S.Kerzel, D.Quarcoo, U.Raap, G.W.Hoyle, W.A.Nockher, and H.Renz. 2002. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *Am J Respir Crit Care Med* 166:818-826.

Pepe, C., S.Foley, J.Shannon, C.Lemiere, R.Olivenstein, P.Ernst, M.S.Ludwig, J.G.Martin, and Q.Hamid. 2005. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:544-549.

Phillips, R.J., M.D.Burdick, K.Hong, M.A.Lutz, L.A.Murray, Y.Y.Xue, J.A.Belperio, M.P.Keane, and R.M.Strieter. 2004. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* 114:438-446.

Plopper, C.G., S.M.Smiley-Jewell, L.A.Miller, M.V.Fanucchi, M.J.Evans, A.R.Buckpitt, M.Avdalovic, L.J.Gershwin, J.P.Joad, R.Kajekar, S.Larson, K.E.Pinkerton, L.S.Van Winkle, E.S.Schelegle, E.M.Pieczarka, R.Wu, and D.M.Hyde. 2007. Asthma/allergic airways disease: does postnatal exposure to environmental toxicants promote airway pathobiology? *Toxicol. Pathol.* 35:97-110.

Plow, E.F., T.A.Haas, L.Zhang, J.Loftus, and J.W.Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275:21785-21788.

Pohunek, P., J.O.Warner, J.Turzikova, J.Kudrmann, and W.R.Roche. 2005. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr. Allergy Immunol.* 16:43-51.

Powell, D.W., R.C.Mifflin, J.D.Valentich, S.E.Crowe, J.I.Saada, and A.B.West. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277:C1-C9.

Puddicombe, S.M., C.Torres-Lozano, A.Richter, F.Bucchieri, J.L.Lordan, P.H.Howarth, B.Vrugt, R.Albers, R.Djukanovic, S.T.Holgate, S.J.Wilson, and D.E.Davies. 2003. Increased expression of p21(waf) cyclin-dependent kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28:61-68.

Quan, T.E., S.E.Cowper, and R.Bucala. 2006. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr. Rheumatol. Rep.* 8:145-150.

Raap, U., C.Goltz, N.Deneka, M.Bruder, H.Renz, A.Kapp, and B.Wedi. 2005. Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:1268-1275.

Radeke, M.J., T.P.Misko, C.Hsu, L.A.Herzenberg, and E.M.Shooter. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325:593-597.

Rahimi, R.A. and E.B.Leof. 2007. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J. Cell Biochem.* 102:593-608.

Raychaudhuri, S.K. and S.P.Raychaudhuri. 2009. NGF and its receptor system: a new dimension in the pathogenesis of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173:470-477.

Regamey, N., M.Ochs, T.N.Hilliard, C.Muhlfeld, N.Cornish, L.Fleming, S.Saglani, E.W.Alton, A.Bush, P.K.Jeffery, and J.C.Davies. 2008. Increased airway smooth muscle mass in children with asthma, cystic fibrosis, and non-cystic fibrosis bronchiectasis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 177:837-843.

- Robins, S.P., G.Milne, A.Duncan, C.Davies, R.Butt, D.Greiling, and I.T.James. 2003. Increased skin collagen extractability and proportions of collagen type III are not normalized after 6 months healing of human excisional wounds. *J. Invest Dermatol.* 121:267-272.
- Robson, M.C., D.L.Steed, and M.G.Franz. 2001. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr. Probl. Surg.* 38:72-140.
- Roche, W.R., R.Beasley, J.H.Williams, and S.T.Holgate. 1989. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1:520-524.
- Rodriguez-Barbero, A., J.Obreo, L.Yuste, J.C.Montero, A.Rodriguez-Pena, A.Pandiella, C.Bernabeu, and J.M.Lopez-Novoa. 2002. Transforming growth factor-beta1 induces collagen synthesis and accumulation via p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in cultured L(6)E(9) myoblasts. *FEBS Lett.* 513:282-288.
- Romagnani, S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:399-408.
- Romagnani, S. 2004. The increased prevalence of allergy and the hygiene hypothesis: missing immune deviation, reduced immune suppression, or both? *Immunology* 112:352-363.
- Roux, P.P. and P.A.Barker. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog. Neurobiol.* 67:203-233.
- Scharffetter, K., M.Kulozik, W.Stolz, B.Lankat-Buttgereit, A.Hatamochi, R.Sohnchen, and T.Krieg. 1989. Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J. Invest Dermatol.* 93:405-412.
- Schurch, W., T.A.Seemayer, and G.Gabbiani. 1998. The myofibroblast: a quarter century after its discovery. *Am J Surg. Pathol.* 22:141-147.
- Scuri, M., L.Samsell, and G.Piedimonte. 2010. The role of neurotrophins in inflammation and allergy. *Inflamm. Allergy Drug Targets.* 9:173-180.
- Sonar, S.S., D.Schwinge, A.Kilic, A.O.Yildirim, M.L.Conrad, K.Seidler, B.Muller, H.Renz, and W.A.Nockher. 2010. Nerve growth factor enhances clara cell proliferation after lung injury. *Eur. Respir J.*
- Staatz, W.D., K.F.Fok, M.M.Zutter, S.P.Adams, B.A.Rodriguez, and S.A.Santoro. 1991. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. *J Biol. Chem.* 266:7363-7367.
- Stevens, P.T., A.Kicic, E.N.Sutanto, D.A.Knight, and S.M.Stick. 2008. Dysregulated repair in asthmatic paediatric airway epithelial cells: the role of plasminogen activator inhibitor-1. *Clin. Exp. Allergy* 38:1901-1910.
- Strecker-McGraw, M.K., T.R.Jones, and D.G.Baer. 2007. Soft tissue wounds and principles of healing. *Emerg. Med Clin North Am* 25:1-22.
- Stupack, D.G. and D.A.Cherness. 2002. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115:3729-3738.
- Sutter, A., R.J.Riopelle, R.M.Harris-Warrick, and E.M.Shooter. 1979. Nerve growth factor receptors. Characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J Biol. Chem.* 254:5972-5982.

Sweeney, S.M., J.P.Orgel, A.Fertala, J.D.McAuliffe, K.R.Turner, G.A.Di Lullo, S.Chen, O.Antipova, S.Perumal, L.Ia-Kokko, A.Forlino, W.A.Cabral, A.M.Barnes, J.C.Marini, and J.D.San Antonio. 2008. Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J. Biol. Chem.* 283:21187-21197.

Tang, W., G.P.Geba, T.Zheng, P.Ray, R.J.Homer, C.Kuhn, III, R.A.Flavell, and J.A.Elias. 1996. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J. Clin. Invest* 98:2845-2853.

ten Dijke, P. and C.S.Hill. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci* 29:265-273.

Tomasek, J.J., G.Gabbiani, B.Hinz, C.Chaponnier, and R.A.Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev Mol Cell Biol.* 3:349-363.

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

Trojanowska, M., E.C.LeRoy, B.Eckes, and T.Krieg. 1998. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J Mol Med* 76:266-274.

Tsapara, A., P.Luthert, J.Greenwood, C.S.Hill, K.Matter, and M.S.Balda. 2010. The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor-beta target gene and effector that regulates alpha-smooth muscle actin expression and cell migration. *Mol. Biol. Cell* 21:860-870.

Van, V.T., P.Chanez, A.Bernard, J.Bousquet, P.Godard, R.Lauwerijs, and Y.Sibille. 1995. Protein content in bronchoalveolar lavage fluid of patients with asthma and control subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:60-68.

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

Vogel, W., G.D.Gish, F.Alves, and T.Pawson. 1997. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell* 1:13-23.

von Mutius E. and D.Vercelli. 2010. Farm living: effects on childhood asthma and allergy. *Nat. Rev. Immunol.* 10:861-868.

Wang, X., X.Tang, X.Gong, E.Albanis, S.L.Friedman, and Z.Mao. 2004. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 127:1174-1188.

Ward, C., D.P.Johns, R.Bish, M.Pais, D.W.Reid, C.Ingram, B.Feltis, and E.H.Walters. 2001. Reduced airway distensibility, fixed airflow limitation, and airway wall remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 164:1718-1721.

Wark, P.A., S.L.Johnston, F.Bucchieri, R.Powell, S.Puddicombe, V.Laza-Stanca, S.T.Holgate, and D.E.Davies. 2005. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *J. Exp. Med.* 201:937-947.

Weathington, N.M., A.H.van Houwelingen, B.D.Noerager, P.L.Jackson, A.D.Kraneveld, F.S.Galin, G.Folkerts, F.P.Nijkamp, and J.E.Blalock. 2006. A novel peptide CXCR

ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. *Nat. Med.* 12:317-323.

Werner, S. and R.Grose. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 83:835-870.

Whittemore, S.R., T.Ebendal, L.Larkfors, L.Olson, A.Seiger, I.Stromberg, and H.Persson. 1986. Development and regional expression of beta nerve growth factor messenger RNA and protein in the rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 83:817-821.

Willis, B.C., R.M.duBois, and Z.Borok. 2006. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc. Am Thorac. Soc* 3:377-382.

Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev Immunol* 17:255-281.

Wills-Karp, M. 2004. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol. Rev.* 202:175-190.

Wilson, J.W., X.Li, and M.C.Pain. 1993. The lack of distensibility of asthmatic airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:806-809.

Wynn, T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524-529.

Wynn, T.A. 2004. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev Immunol* 4:583-594.

Wynn, T.A. 2003. IL-13 effector functions. *Annu. Rev Immunol* 21:425-456.

Zeisberg, E.M., O.Tarnavski, M.Zeisberg, A.L.Dorfman, J.R.McMullen, E.Gustafsson, A.Chandraker, X.Yuan, W.T.Pu, A.B.Roberts, E.G.Neilson, M.H.Sayegh, S.Izumo, and R.Kalluri. 2007. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med* 13:952-961.

Zhu, Z., R.J.Homer, Z.Wang, Q.Chen, G.P.Geba, J.Wang, Y.Zhang, and J.A.Elias. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest* 103:779-788.

Zupan, A.A., P.A.Osborne, C.E.Smith, N.R.Siegel, R.M.Leimgruber, and E.M.Johnson, Jr. 1989. Identification, purification, and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor. *J Biol. Chem* 264:11714-11720.

Zuyderduyn, S., M.B.Sukkar, A.Fust, S.Dhaliwal, and J.K.Burgess. 2008. Treating asthma means treating airway smooth muscle cells. *Eur. Respir. J.* 32:265-274.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -SMA	alpha- smooth muscle actin
°C	Grad Celsius
ADAM	A disintegrin and metalloprotease domain
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATF2	activating transcription factor 2
BAL/F	Bronchoalveoläre Lavage /Flüssigkeit
BCA	Bichinonic assay
Bcl2	B- cell lymphoma 2
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BG	Bindegewebe
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Compliance
CAST	Computer assisted stereological toolbox
CCR	CC-Chemokin Rezeptor
CCSP	Clara cell secretory protein
CD	Cluster of differentiation
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
col3(α 1)	alpha1 Kette des Kollagen Typ III
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CREB	cAMP response element binding protein
CTGF	Connective tissue growth factor
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECP	eosinophilic cationic protein
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMT	epithelial mesenchymal transition

EMTU	epithelial mesenchymal trophic unit
EPX	eosinophil Peroxidase
ERK	extracellular regulated kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	focal adhesion kinase
FCS	Fötales Kälberserum
FcεRI	Hochaffiner Rezeptor für IgE
FEV1	Forced expiratory volume in 1 second
FGF	fibroblast growth factor
G	Gauge
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
HE	Hämatoxilin & Eosin
i.m.	intra musculär
i.p.	intra peritoneal
IB	Immunoblot
Ibl	Anzahl der Schnittpunkte mit der Referenzoberfläche
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IP3	Inositol trisphosphat
IRAK	IL1 receptor associated kinase
JNK	c-Jun terminal Kinase
L(P)	Länge pro Testpunkt
L.	Lamina
LK	Lymphknoten
LT	Leukotrien
Luc	Luziferase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBP	major basic protein
MCS	multiple cloning site
MEF-2	myocyte enhancer factor 2
MHC	major histocompatibility
MLF	Lungenfibroblasten aus der Maus
MMP	matrix-metalloprotease
mRNA	messenger RNA
NFκB	nuclear factor κ B
NGF	Nerve growth factor

Oligo-dT	Oligomer bestehend aus 18 Thymidinen
OVA	Ovalbumin
P comp	Anzahl der positiven Ereignisse
PAS	Periodic-Acid Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDGF-A	platelet derived growth factor-A
PDK-1	phosphoinosit-dependent kinase-1
PEEP	Postiver endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3-Kinase
PLC	Phospholipase
Pro-/NT	Pro-/Neurotrophin
p-Tyr	Phospho-Tyrosin
R	Resistance
Raf	Rat fibrosarcoma
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted
Ras	Rat sarcoma
rh	Rekombinant human
RIP	receptor interacting protein
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time PCR
Shc	src homology containing protein
SMAD	mothers against decapentaplegic homolog
SM-MHC	smooth muscle myosin heavy chain
SURS	systematic randomized uniform sampling
T β Ri/II	TGF β Rezeptorkette I/II
tcomp	arithmetische Verdickung
TCR	T-Zell Rezeptor
Tg	Transgen
TGF β 1	Transforming growth factor beta 1
TIMP	tissue inhibitor of metalloprotease
TK	Transkription

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor associated protein
Trk	Tropomyosin related Kinase
TV	Tidalvolumen
V	Volumen
WB	Western blot
WT	Wildtyp

9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1 Die allergische Entzündungsreaktion: Sensibilisierung und Effektorphase.....	10
Abb.2 Pathomechanismen der Fibroseentstehung.....	16
Abb.3 Übersicht der Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren.....	20
Abb.4 Intrazelluläre Signalkaskaden der aktivierten Neurotrophinrezeptoren.....	21
Abb.5 Strukturelle Veränderungen in der chronisch allergischen Atemwegsentzündung werden von erhöhten NGF- Konzentrationen begleitet.....	57
Abb.6 NGF induziert die col3(α 1)- mRNA Expression in primären Lungenfibroblasten aus der Maus <i>in vitro</i>	59
Abb.7 Die systemische NGF- Neutralisierung beeinträchtigt nicht den Immunisierungsstatus.	61
Abb.8 Die Neutralisierung von NGF im Modell der chronischen Atemwegsentzündung verhindert die Ausbildung einer peribronchialen Fibrose.....	62
Abb.9 Die systemische anti-NGF Gabe supprimiert die chronisch allergische Atemwegsentzündung.	65
Abb.10 Die lokale Überexpression von NGF führt zur verstärkten Kollagenablagerung in Unabhängigkeit einer Entzündung.	67
Abb.11 NGF-Tg Mäuse weisen eine veränderte Lungenphysiologie auf.	69
Abb.12 Die chronisch allergische Atemwegsentzündung führt zu keiner weiteren Steigerung der Kollagenablagerung in NGF-Tg Mäusen.....	70
Abb.13 NGF aktiviert den Rezeptor p75 ^{NTR} nicht zur col3(α 1)-mRNA Expression <i>in vitro</i>	72
Abb.14 Die funktionelle Expression des NGF- Rezeptors p75 ^{NTR} ist an der verstärkten Kollagenablagerung in NGF-Tg Mäusen nicht beteiligt.	74
Abb.15 NGF aktiviert die col3(α 1)- Transkription über TrkA-Signalwege.	76
Abb.16 NGF aktiviert die col3(α 1)- Transkription über die Aktivierung der p38 MAPK.	79
Abb.17 NGF induziert die col3(α 1)-mRNA Expression in Lungenfibroblasten über die Aktivierung der p38 MAPK <i>in vitro</i>	81
Abb.18 NGF induziert die col3(α 1)-mRNA Expression in Lungenfibroblasten unabhängig vom TGF β 1/SMAD-Signalweg.....	84
Abb.19 TGF β 1-Spiegel sind in den Atemwegen und der Lunge NGF-Tg Mäuse nicht erhöht.	85

10. VERÖFFENTLICHUNGEN & KONGRESSBEITRÄGE

Kilic A, Sonar S, Yildirim AO, Fehrenbach H, Nockher WA and Renz H. Nerve Growth Factor induces type III collagen production in chronic allergic airway inflammation. **(zur Publikation eingereicht bei dem Journal of Allergy and Clinical Immunology, in revision)**

Weitere Veröffentlichungen:

Conrad ML, Yildirim AO, Sonar SS, **Kilic A**, Sudowe S, Lunow M, Teich R, Renz H, Garn H. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clin Exp Allergy**. 2009 Aug;39(8):1246-54. Epub 2009 May 3.

Sonar SS, Schwinge D, **Kilic A**, Yildirim AO, Conrad ML, Seidler K, Müller B, Renz H, Nockher WA. Nerve growth factor enhances clara cell proliferation after lung injury. **Eur Respir J**. 2010 Jul;36(1):105-15. Epub 2010 Jan 14.

Sonar SS, Hsu Y, Conrad ML, Majeau GR, **Kilic A**, Garber E, Gao Y, Nwankwo C, Willer G, Kim H, Bailly V, Rennert PD, Renz H. Antagonism of TIM-1 blocks the development of disease in a humanized mouse model of allergic asthma. **J Clin Invest**. 2010 Aug 2;120(8):2767-81. doi: 10.1172/JCI39543. Epub 2010 Jul 12.

Alrifai M.*, Marsh L.M.*, Dicke T., **Kilic A**, Conrad M., Renz H., and Garn H. Spatial and temporal dynamics of the induction and resolution of airway remodelling and inflammation using an allergic mouse model of chronic asthma. (manuscript in preparation)

Veröffentlichte Abstracts und Kongressbeiträge

A Kilic, S Sonar, C Hahn, D Schwinge, AO Yildirim, S Achenbach, H Fehrenbach, H Renz, WA Nockher. Exclusive regulation of collagen expression by nerve growth factor (NGF). **Allergo J.**, 16(1) (2007)- Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), Mainz 2007

A Kilic, S Sonar, C Hahn, D Schwinge, AO Yildirim, S Achenbach, H Fehrenbach, H Renz, WA Nockher. Überexpression des Nerve Growth Factor (NGF) führt zu

verstärktem Umbau der Atemwege in einem Modell des experimentellen chronischen Asthma. Herbsttagung der DGAKI, Lübeck 2007

A Kilic, S Sonar, AO Yildirim, H Fehrenbach, H Renz, WA Nockher. Erhöhte Spiegel von NERVE GROWTH FACTOR (NGF) in den Atemwegen führen zur Beeinträchtigung der Lungenfunktion. **Allergo J.**, 17(1) (2008)- Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinischer Immunologie, Mainz. 2008

A Kilic, S Sonar, C Hahn, AO Yildirim, H Fehrenbach, H Renz, WA Nockher. NGF (NERVE GROWTH FACTOR) a candidate for airway remodelling? American Thoracic Society, 2008, Toronto, Kanada

A Kilic, S Sonar, AO Yildirim, H Fehrenbach, H Renz, WA Nockher. NGF (NERVE GROWTH FACTOR) a candidate for airway remodelling? **Allergo J.**, 18(1) (2009)- Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und Klinischer Immunologie, Mainz. 2009

A Kilic, S Sonar, AO Yildirim, H Renz, WA Nockher. Nerve Growth Factor: a candidate for airway remodelling? **Allergy** 64 (Suppl. 90):88 (2009) European Academy of Allergy and Clinical Immunology 2009, Warschau, Polen

Ayse Kilic, Sanchaita Sonar, Ali Oender Yildirim, Harald Renz, Wolfgang Andreas Nockher. Nerve Growth Factor: A candidate for airway remodeling? **Brain, Behaviour and, Immunity**, 23 (2009) S1. German-Endocrine-Brain-Immune-Network 2009, Frankfurt

11. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

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

Besedovsky, Dalpke, Daut, del Rey, Eilers, Elsässer, Feuser, Garten, Gudermann, Hasilik, Heeg, Jacob, Jungclas, Kirchner, Klenk, Koolman, Lang, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Moll, Müller, Petz, Renkawitz-Pohl, Renz, Röhm, Röper, Schäfer, Seitz, Schäfer, Weihe

12. CURRICULUM VITAE

Persönliche Angaben: Ayse Kilic
Wilhelmstr. 19A
35037 Marburg
geb. am 20.10.1979 in Kehl

Ausbildung:

1990 bis 1999 Albert- Einstein- Gymnasium (Allgemeine Hochschulreife) in Kehl

2000 bis 2001 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg

2001 bis 2006 Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
(Schwerpunkt Infektionsbiologie)

2005 bis 2006 Diplomarbeit
Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik,
Klinikum der Philipps-Universität Marburg
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Harald Renz

2006 bis 2010 Promotion
Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik, Klinikum der Philipps-Universität Marburg
Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Harald Renz

(Ort/Datum)

(Ayşe Kılıç)

13. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die, dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte, Arbeit mit dem Titel:

„Nerve Growth Factor (NGF): ein pro-fibrotischer Faktor im Modell der chronisch allergischen Atemwegsentzündung“

im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik unter Leitung von Prof. Dr. Harald Renz ohne sonstige Hilfe, selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel, benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um eine Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile dieser Arbeit sind bei dem *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (JACI) zur Publikation eingereicht.

(Ort/Datum)

(Ayşe Kılıç)

DANKSAGUNG

- ❖ Prof. Dr. Harald Renz danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Geduld und, vor allem, für die Unterstützung bis zur Fertigstellung der Arbeit.
- ❖ Für die Finanzierung dieser Arbeit sei an dieser Stelle auch PD Dr. Andreas Nockher gedankt.
- ❖ Prof. Heinz Fehrenbach danke ich für die schönen Bilder zur NGF-Tg Maus.
- ❖ Moses V. Chao danke ich für die unkomplizierte und schnelle Bereitstellung der TrkA-Expressionsplasmide und die hilfreichen Tipps zu Neurotrophinen.
- ❖ Auch den Mitgliedern der AG Renz, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken. In diesem Zusammenhang ein großes Dankeschön an:
 - Katrin Seidler, die unermüdlich den Großteil der Tippfehler aus diesem Dokument entfernt hat.
 - Stefanie Hagner-Benes für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
 - Frank Dederichs und Nicole Disser für die Zucht und Genotypisierung der vielen Mäuse.
 - Katrin Seidler, Hani Harb, Mohammed Al-Rifai, Jule Dietze und Min Zhao danke ich für die gute Stimmung im Büro. Hatten in der Zeit viel zu lachen!!!
 - Der AG Al-Fakhri danke ich für die Bereitstellung vieler Antikörper, die zu diesen schönen blots beigetragen haben.
- ❖ Meinen Freunden, die mich sowohl vor als auch während des Studiums und der Promotion begleitet, immer wieder aufgemuntert und, wenn nötig, auch abgelenkt haben, sei an dieser Stelle gedankt.
- ❖ Vor allem meiner Familie, die meine Begeisterung für diese Arbeit vielleicht nicht immer nachvollziehen konnte, danke ich für die ununterbrochene Unterstützung und Nachsicht während meines Studiums und der Promotion.