Die Expression, Lokalisation und Regulation der „glial cell line derived neurotrophic factors“ (GFLs) bei allergischer Atemwegsentzündung in der Maus

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Annette Weske

aus Lahnstein

Gießen 2016

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs
Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

AG Kardiopulmonale Neurobiologie bei Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer

Gutachterin: Prof. Dr. Heidrun Krämer

Tag der Disputation: 18.07.2017

Gliederung

1 Einleitung 1

1.1 Asthma bronchiale 1

1.1.1 Definition, Epidemiologie, Symptome und Pathogenese 1

1.1.2 Therapie 2

1.2 Die allergische Reaktion 3

1.2.1 Die Sensibilisierung 3

1.2.2 Typ 1-Reaktion 3

1.3 Innervation der Atemwege 4

1.3.1 Efferente Innervation 4

1.3.2 Afferente Innervation 5

1.3.2.1 Klassen von afferenten atemwegsinnervierenden Neuronen 5

1.3.3 Lokalisation der atemwegsinnervierenden afferenten Neurone in peripheren Ganglien 6

1.4 Atemwegshyperreagibilität 7

1.4.1 TRP-Rezeptoren 8

1.4.1.1 TRPV1 9

1.4.1.2 TRPA1 10

1.5 Glial cell line derived neurotrophic factors 11

1.5.1 GDNF 12

1.5.2 Neurturin 13

1.5.3 Artemin 13

1.5.4 Persephin 14

1.5.5 Rezeptoren der GFLs 14

1.5.5.1 Weitere Rezeptoren der GFLs 16

1.5.5.2 Expression der GFL-Rezeptoren im Ggl. jugulare/nodosum 17

1.6 Fragestellung/Hypothese 17

2 Material und Methode 19

2.1 Verwendete Geräte 19

2.2 Verwendete Chemikalien 19
2.3 Tierhaltung 20
2.3.1 Behandlungsprotokoll zur Induktion einer Atemwegsinflammation 20
2.3.2 Tierschutzkonforme Tötung und Präparation 21
2.3.3 Zellzahlbestimmung und Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavage 21
2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion 23
2.4.1 RNA Isolation mit dem RNeasy Mini Plus Kit 23
2.4.2 DNA-Verdau und Reverse Transkription 23
2.4.3 Qualitative Polymerasekettenreaktion 24
2.4.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion 25
2.4.5 Auswertung der quantitativen PCR 26
2.4.6 Gelelektrophorese 26
2.5 Immunhistologie 27
2.6 Westernblot 29
2.6.1 Harnstoffextraktherstellung 30
2.6.2 Proteinbestimmung mit Pierce 660 nm Protein Assay am Nanodrop 30
2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese 31
2.6.4 Transfer 32
2.6.5 Immundetektion 33
2.6.6 Chemilumineszenzdetektion 34
2.6.7 Densitometrie und Auswertung der Bandenintensitäten der Westernblots 34
2.7 Laserassistierte Mikrodissektion 35
2.7.1 Die Mikrodissektion 35
2.7.2 RNA-Isolation mit dem Micro Kit 37
2.7.3 cDNA-Synthese von Proben der laserassistierten Mikrodissektion 37
2.8 Calciummessungen 38
2.8.1 Beschichtung der Deckgläschen 38
2.8.2 Dissoziation und Stimulation der Zellen des Ggl. jugulare/nodosum 38

2.8.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration 39
2.9 Statistik 41
3 Ergebnisse 42
3.1 Auszählung und Differenzierung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage 42
3.1.1 Gesamtzellzahlen und Differentialzytologie 42
3.2 mRNA-Expression der GFLs in den Atemwegen und der GFL-Rezeptoren in Neuronen des Ggl. jugulare/nodosum 43
3.2.1 mRNA-Expression der GFL-Rezeptoren im Ggl. jugulare/nodosum 43
3.2.2 GFL-mRNA-Expression in Lunge und Trachea 44
3.2.3 Lokalisation der mRNA-Expression 46
3.2.4 Veränderung der GFL-mRNA-Expression im Modell der allergischen Atemwegsentzündung 47
3.3 Proteinexpression der GFLs 48
3.3.1 Immunhistochemie 48
3.3.2 Veränderung der GFL-Proteinexpression und -Lokalisation im Modell der allergischen Atemwegsentzündung 50
3.3.3 Quantitative Veränderung der GFL-Proteinexpression im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung 52
3.3.3.1 Validierung der Westernblotanalyse 52
3.3.3.2 Semiquantitative Bestimmung der Proteinexpressionsstärke von GDNF und Artemin und ihr Vergleich zwischen PBS- und OVA-Gruppe 55
3.4 Einfluss der GFLs auf den Anteil der Capsaicin- und Zimtaldehyd-positiven Neurone an der Gesamtneuronenzahl 58
3.5 Einfluss der GFLs auf den intrazellulären Calciumanstieg 59
4 Diskussion 62
4.1 Die Induktion einer allergischen Atemwegsinflammation im Mausmodell des Asthma bronchiale 62
4.2 Der Nachweis der GFL-Rezeptoren und von TRPV1 in den sensiblen Ganglien des N. vagus 63
4.3 Die Expression der GFLs in den Atemwegen und ihre Regulation bei allergischer Atemwegsinflammation 64
4.4 Die Lokalisation der GFLs in den Atemwegen 72

4.5 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf die funktionellen Eigenschaften der C-Faserneurone des Ggl. jugulare/nodosum 76

4.5.1 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf die prozentualen Anteile der Capsaicin- und Zimtaldehyd-reaktiven Neurone 76

4.5.2 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf den Capsaicin-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration 79

4.6 Schlussfolgerung 82

5 Zusammenfassung 83

6 Summary 84

7 Abkürzungsverzeichnis 85

8 Abbildungsverzeichnis 89

9 Tabellenverzeichnis 90

10 Literaturverzeichnis 91

11 Publikationsverzeichnis 100

11.1 Posterpräsentationen 100

12 Ehrenwörtliche Erklärung 101

13 Danksagung 102

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Definition, Epidemiologie, Symptome und Pathogenese

Asthma bronchiale ist eine sehr häufige, chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege mit entzündungsbedingter Atemwegshyperreagibilität (AHR), die zu einer anfallsartigen bzw. variablen Atemwegsobstruktion führt. Diese ist entweder spontan oder nach Behandlung mit entsprechenden Medikamenten (teil-)reversibel. Ca. 1-18% der Weltbevölkerung (je nach Region) leiden an Asthma. In Deutschland sind 8,8% der Bevölkerung erkrankt. Es sind ca. 10% der Kinder und 5% der Erwachsenen betroffen (Herold, 2013; Global Initative for Asthma, 2015). Die Patienten leiden an Symptomen in variabler Ausprägung, wie anfallsartiger Atemnot, Brustenge, trockenem Reizhusten, einer verlängerten Exspiration und einem pfeifenden Atemgeräusch, das als Giemen und Brummen auskultiert werden kann.

Es werden zwei Hauptformen der Erkrankung unterschieden: Das nicht-allergische, intrinsische Asthma, das z.B. durch Infekte, pseudoallergische Reaktionen auf Analgetika oder chemisch-toxische Irritantien ausgelöst wird, tritt vor allem im Erwachsenenalter auf. Das allergische, extrinsische Asthma, das vor allem bei Kontakt mit Allergenen wie Pollen, Hausstaubmilben, Tierhaaren usw. auftritt, betrifft hingegen meist Kinder und Jugendliche. Meist kommt es jedoch zu Mischformen (Global Initative for Asthma, 2015; Deutsche Atemwegsliga e.V. & Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 2005; Herold, 2013).

Neben der genetischen Anlage des Patienten, die zur einer Atopieneigung mit überschießender IgE-Bildung führt, tragen auch exogene Auslöser wie Allergene oder Infekte zur Entstehung des Asthma bronchiale bei. Kommen beide Faktoren zusammen, können sie zu einer Atemwegsinflammation führen. Folgend können eine bronchiale Hyperreaktivität und evtl. ein Asthma bronchiale entstehen (Herold, 2013).

Die verschiedenen Symptome des Asthmas sind durch die Pathogenese der Erkrankung erklärbar, die maßgeblich durch drei Faktoren zustande kommt: (1.) Die bronchiale Entzündung durch Allergene oder Infekte. Dabei spielt vor allem die Aktivität der Mastzellen, T-Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Entzündungsmediatoren eine Rolle. (2.) Die AHR auf verschiedene Irritantien. (3.) Die bronchiale Obstruktion, die durch einen Bronchospasmus, ein Schleimhautödem, die vermehrte Produktion eines zähen Schleims (Hypsekretion/Dyskrinie) sowie durch längerfristige Umbauvorgänge der Atemwegswände (*airway remodeling*) zustande kommt. Da durch die beschriebenen Faktoren der Pathogenese nur ein Teil der Symptome, wie die verlängerte Exspiration, das pfeifende Atemgeräusch, die Brustenge und die Atemnot, erklärbar sind, ist ein alternativer Erklärungsansatz zur

Genese der restlichen Symptome, vor allem des Hustens und der AHR notwendig. Eine Möglichkeit ist, dass die Symptome das Ergebnis von Reflexbögen zur neuronalen Kontrolle der Atemwegsfunktion sind. Der Reflex wird durch Stimulation der afferenten Neurone eingeleitet und führt zur Informationsübertragung in Form von Aktionspotentialen ans zentrale Nervensystem (ZNS). Dort werden die Informationen integriert und führen zu Veränderungen im Atemmuster und den Aktivitäten der parasympathischen präganglionären Neurone, oder zu den oben genannten Symptomen, wie Husten und Atemnot, die dem Patienten bewusst werden (Undem & Carr, 2002).

1.1.2 Therapie

Die etablierten Therapiemöglichkeiten des Asthmas sind bis heute rein symptomatisch. Die Standardmedikation nach Stufenschema beinhaltet eine Reihe bronchodilatatorisch wirksamer Präparate wie β2-Adrenorezeptoragonisten, die nach ihrem Wirkeintritt und der Wirkdauer unterteilt werden. Häufig wird z.B. Salbutamol als schnellwirksamer β2-Agonisten als Bedarfsmedikation genutzt. Das langwirksame Formoterol kann hingegen nicht nur bei Bedarf, sondern ab Stufe 3 auch zur Dauermedikation genutzt werden. Weitere Bronchodilatatoren sind kompetitiv wirkende Antimuskarinica, wie z.B. Ipratropiumbromid, die die bronchokonstriktorischen Effekte des Acetylcholins (ACh) hemmen. In seltenen und schweren Fällen kann auch Theophyllin als Bronchodilatator zum Einsatz kommen. Zudem werden antientzündliche Medikamente verabreicht. Am häufigsten werden dabei Corticosteroide genutzt. Ihre Applikationsform und Dosierung variiert nach dem Schweregrad der Erkrankung. In der Regel wird das Medikament inhalativ verabreicht, bei schweren Fällen kann zusätzlich eine orale Gabe erwogen werden. Außerdem können Leukotrienrezeptorantagonisten wie Montelukast, Mastzellstabilisatoren wie Cromoglycinsäure und Omalizumab als Antikörper gegen IgE angewandt werden (Deutsche Atemwegsliga e.V. & Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, 2005; Dinh et al., 2011; Herold, 2013).

Die genannten Therapeutika lindern zwar die Symptome wie die Obstruktion, Inflammation und Hypersekretion, aber sind nicht in der Lage, sie kausal zu verhindern, daher ist es von großem Interesse, weitere Möglichkeiten für die Pharmakotherapie der Erkrankung zu finden.

1.2 Die allergische Reaktion

Unter einer Allergie wird eine nachteilige und überschießende Aktivierung des Immunsystems bei Kontakt mit harmlosen Umweltantigenen verstanden. Häufig entwickelt sich eine Allergie auf Grundlage einer Atopie. Diese bezeichnet eine vererbte Neigung auf zahlreiche, harmlose Umweltantigene spezifische IgE Antikörper zu bilden. Betroffene Atopiker erkranken daher häufig an mehreren allergischen Typ I-Krankheiten, wie z.B. Neurodermitis, allergischer Rhinitis und Konjunktivitis, Urtikaria, und bestimmten Nahrungsmittelallergien (Holtmann et al., 2013).

1.2.1 Die Sensibilisierung

Grundlage einer allergischen Reaktion ist die Sensibilisierung. Dabei werden primär ungefährliche exogene Umweltantigene vor allem von dendritischen, aber auch anderen antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert, prozessiert, über Klasse-II-HLA-Moleküle/MHC-II-Rezeptoren (Humanes Leukozytenantigen/*major histocompatibility complex*) präsentiert und von naiven $CD4^+$ Zellen (*cluster of differentiation* 4^+/T-Helferzellen) erkannt. Wenn das präsentierte Antigen mit dem spezifischen T-Zellrezeptor in Verbindung tritt, wird die naive T-Zelle zu einer aktiven T-Helferzelle aktiviert. Bei Atopikern werden vermehrt antigenspezifische T-Helferzellen vom Typ 2 (TH2) induziert. Diese sezernieren die Zytokine Interleukin-(IL)-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13. IL-4 und IL-5 verlängern die Viabilität der Eosinophilen und stimulieren die Proliferation von B-Lymphozyten. IL-10 und IL-13 erhöhen die Immunglobulin-Synthese, so dass eine Immunantwort mit Beteiligung des B-Zellsystems eingeleitet wird. Das von den T-Helferzellen sezernierte Zytokinmuster beeinflusst, welche IgG-Isotypen die B-Zellen produzieren. IL-4 verursacht einen Isotypenswitch von IgM auf IgG und IgE (Holtmann et al., 2013).

1.2.2 Typ 1-Reaktion

Schon 1963 haben Coombs und Gell die allergischen Reaktionen in vier unterschiedliche Typen eingeteilt. Beim allergischen Asthma handelt es sich um eine Typ 1-Reaktion vom Soforttyp. Die IgE-Monomere binden mit ihrem Fc-Fragment an Fc_ε-Rezeptoren I und II auf Mastzellen und basophilen Granulozyten. Durch die Bindung des entsprechenden Antigens werden die IgE-Moleküle kreuzvernetzt. Dadurch werden diese Zellen aktiviert und es kommt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren, wie Histamin, Proteasen, Proteoglykanen, Carboxypeptidase A, Prostaglandinen und Leukotrienen. Diese führen nach Sekunden bis Minuten zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion mit Ödemen, die auf die Dilatation und Permeabilitätssteigerung der Gefäße zurückzuführen sind, vermehrter

Schleimproduktion und Bronchospasmen. Aufgrund der kurzen Latenz bis zum Symptombeginn wird diese Phase als Frühphase oder Mediatorphase bezeichnet. Zusätzlich ausgeschüttete Zytokine verstärken die Inflammation durch Rekrutierung anderer Immunzellen und Anregung derer Zytokinproduktion. Nach 3-8 h kommt es bei den meisten Patienten zu einer Spätphase-Reaktion (*late-phase asthmatic response*; LAR). Diese ist durch Infiltration von Entzündungszellen im Lungengewebe, Ödeme der Schleimhaut, Hypersekretion eines zähen Bronchialmukus und Bronchialobstruktion, sowie verstärkte Dyspnoe charakterisiert (Holtmann et al., 2013).

1.3 Innervation der Atemwege

1.3.1 Efferente Innervation

Die efferente Innervation der Lunge setzt sich aus parasympathischen und sympathischen Anteilen zusammen. Die cholinergen, präganglionären parasympathischen Fasern entstammen dem Ncl. dorsalis n. vagi und dem Ncl. ambiguus in der Medulla oblongata und ziehen von dort in den beiden Nn. vagi zu den Atemwegen, wo sie in parasympathischen Ganglien (Ggll.) auf die postganglionären Neurone umgeschaltet werden (Barnes, 1992). Die Stimulation dieser Neurone ist für die klinischen Symptome des Asthmas, wie Bronchokonstriktion und Hypersekretion von zähem Mukus verantwortlich (Barnes, 1992). Zusätzlich existieren parasympathische, non-cholinerge Neurone, die durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) dilatatorisch auf Bronchien und Gefäße wirken (Kummer et al., 1992b; Fischer et al., 1996; Martling et al., 1990).

Die präganglionären Neurone des Sympathikus, die Trachea und Lunge innervieren, liegen im Seitenhorn des Rückenmarks und nutzen ACh als Transmitter zur Informationsübertragung auf das postganglionäre Neuron. Die postganglionären Perikaryen, die die Lunge innervieren, sind in Ggll. des Grenzstrangs neben der Wirbelsäule auf Höhe T3-T5 und im Ganglion (Ggl.) stellatum lokalisiert. Die postganglionären Neurone, die die Trachea sympathisch innervieren, sind hingegen im Ggl. stellatum und im Ggl. cervicale superius (SCG) lokalisiert. Von den Ggll. gelangen die Neurone zu den Atemwegen und innervieren Blutgefäße und Drüsen der Submukosa. Der Transmitter zur Informationsübertragung vom postganglionären sympathischen Neuron auf das Erfolgsorgan ist Noradrenalin (Belvisi, 2002; Kummer et al., 1992a).

1.3.2 Afferente Innervation

1.3.2.1 Klassen von afferenten atemwegsinnervierenden Neuronen

Es existieren verschiedene Klassen von afferenten lungeninnervierenden Neuronen, die unter anderem durch ihre verschiedenen Leitungsgeschwindigkeiten unterschieden werden können (Undem & Weinreich, 1993). Unmyelinisierte C-Faserneurone weisen eine charakteristisch langsame Leitungsgeschwindkeit von 0,8-1,2 m/s auf, während die myelinisierten A-Faserneurone Geschwindigkeiten zwischen 10-30 m/s erreichen können.

Die Rezeptoren der Atemwege können in vier große Gruppen unterteilt werden. Die A-Faserneurone werden in *slowly adapting stretch receptors* (SARs) und *rapidly adapting stretch receptors* (RARs) unterteilt und von den unmyelinisierten C-Faserneuronen und den spezialisierten Rezeptoren, z.B. für Geschmack oder Propriozeption, unterschieden (Widdicombe, 1982; Undem & Carr, 2002). Die SARs sind in der glatten Muskulatur der Atemwege lokalisiert (Barnes, 1992) und spielen vor allem bei der Regulation der Atemmuster eine große Bedeutung. Sie sind verantwortlich für den Hering-Breuer Reflex, der reflektorisch die Inspiration beendet, um eine Lungenüberdehnung zu verhindern (Widdicombe, 1982; Barnes, 1992). Die RARs reagieren primär auf Veränderungen der mechanischen Eigenschaften und auf chemische Irritantien. Sie spielen vor allem für den Schutz der Atemwege eine wichtige Rolle (Sant'Ambrogio, 1982; Widdicombe, 1982). Sie werden auch als „*irritant receptor*" bezeichnet und liegen vor allem in den proximalen Atemwegen. Die Dichte dieser Nervenfasern steigt von der oberen intrathorakalen Trachea bis zu den Lobärbronchien und fällt dann in den kleinsten Bronchien stark ab. Dieses Verteilungsmuster unterstützt die Abwehrmechanismen gegen verschiedene chemische und mechanische Irritantien, z.B. durch reflektorisches Husten, Verschluss der Stimmritze, Bronchokonstriktion und Hyperventilation (Mortola et al., 1975). Die unmyelinisierten C-Faserneurone sind chemosensible Neurone. Auch ihre Endigungen sind innerhalb des Atemwegsepithels und subepithelial lokalisiert (Watanabe et al., 2005). C-Faserneurone reagieren auf Gewebezerstörung und Ödeme bzw. auf Mediatoren, die bei solchen Prozessen freigesetzt werden, z.B. Histamin und Prostaglandine (Widdicombe, 1982).

Ein hochselektiver exogener Stimulus der C-Faserneurone ist Capsaicin (CPS). Selbst die hundertfache Menge der Konzentration, bei der in C-Faserneuronen bereits eine Reaktion ausgelöst werden konnte, bewirkte bei Versuchen in Meerschweinchen keine Entladung der Aδ-Fasern (Fox et al., 1993). Die CPS-Stimulation der C-Faserneurone der Atemwege bewirkt eine Bradykardie und Hypotension sowie eine vermehrte Drüsensekretion und eine Konstriktion der glatten Muskulatur der Atemwege durch

eine Reflexantwort. Diese kann durch die Durchtrennung oder das Kühlen des unteren Anteils des N. vagus unterbunden werden (Davis et al., 1982). Zudem existieren Vermutungen, dass Neuropeptid-exprimierende C-Faserneurone bei ihrer Aktivierung durch die Freisetzung von Neuropeptiden wie *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), Substanz P und Neurokinin A (Kummer et al., 1992a; Martling et al., 1988) einen Beitrag zur so genannten „neurogenen Inflammation" leisten. Diese führt zur Infiltration der Atemwege mit Entzündungszellen. Außerdem kommt es zu einer Vasodilatation mit Bronchialödem, Bronchokonstriktion, und Mukussekretion (Martling et al., 1988; Dunzendorfer et al., 1998; McDonald, 1987; Jancsó et al., 1967). Da sowohl die gewebezerstörenden Prozesse, die die C-Faserneurone aktivieren, als auch die verschieden initiierten Effekte beim Asthma bronchiale gehäuft auftreten, gilt den C-Faserneuronen ein besonderes Interesse in dieser Arbeit.

1.3.3 Lokalisation der atemwegsinnervierenden afferenten Neurone in peripheren Ganglien

Die Zellkörper der atemwegsinnervierenden afferenten Neurone liegen im rechten und linken Ggl. jugulare/nodosum und in den Spinalganglien (*dorsal root ganglia*, DRGs). Der Nachweis wurde durch Versuchsergebnisse erbracht, die zeigen, dass die Ggll. nach der Injektion eines Farbstoffes in die Atemwege retrograd markiert werden (Springall et al., 1987; Kummer et al., 1992a). Das Ggl. jugulare/nodosum ist ein zusammengesetztes Ggl. aus zwei Anteilen, wobei das Ggl. jugulare seinen embryologischen Ursprung in der Neuralleiste hat und das Ggl. nodosum den Plakoden entstammt (Zhuo et al., 1997). Die atemwegsinnervierenden vagalen C-Faserneurone, die durch ihre positive Reaktion auf CPS charakterisiert sind, können anhand ihrer Aktivierung durch bestimmte Stimuli und der Expression bestimmter Gene jeweils einem der beiden vagalen Ggll. zugeordnet werden. Die Neurone des Ggl. nodosum reagieren aufgrund ihrer Expression der Rezeptoren P2X2 und P2X3 auf die Stimulation mit dem Rezeptoragonisten α,β-Methylene-ATP. Die im Ggl. jugulare lokalisierten Neurone exprimieren P2X2 nicht und reagieren folglich nicht auf die Stimulation mit α,β-Methylene-ATP. Die Neurone der DRGs ähneln in ihrem Expressionsmuster und Aktivierungsprofil sehr den Neuronen des Ggl. jugulare, da sie auch aus der Neuralleiste entstammen (Nassenstein et al., 2010; Undem et al., 2004).
Bei Untersuchungen zur Innervation der Trachea konnte gezeigt werden, dass der größere Anteil aller sensiblen vagalen Neurone mit 65% dem Ggl. nodosum zuzurechnen ist. Im Seitenvergleich entstammt der größere Anteil der tracheainnervierenden Neurone mit 61%-65% dem rechten N. vagus (Kummer et al., 1992a; Springall et al., 1987). Bei isolierten Untersuchungen der einzelnen Klassen der

sensiblen Neurone zeigte sich, dass fast alle C-Faserneurone, die die Trachea bzw. die extrapulmonalen Atemwege innervieren, im Ggl. jugulare lokalisiert sind. Unter 2% der tracheainnervierenden C-Faserneurone entstammen dem Ggl. nodosum (Undem et al., 2004; Ricco et al., 1996). Nur ca. 4% der retrograd markierten, tracheainnervierenden Neurone sind in den DRGs auf Segmenthöhe C1-C6, mit dem Hauptteil zwischen C2-C5 lokalisiert (Springall et al., 1987; Kummer et al., 1992a).
Beim Vergleich der Lokalisation der Perikarya der lungeninnervierenden Neurone nach Injektion eines Farbstoffes in beide Lungenflügel zeigt sich, dass der Großteil der retrograd markierten Perikarya mit 72-78% in den vagalen Ggll. auf der ipsilateralen Seite der Injektion lokalisiert ist. Der größere Anteil der lungeninnervierenden Neurone der beiden vagalen Ggll. liegt ebenfalls im Ggl. nodosum (Springall et al., 1987). Bei der isolierten Untersuchung der lungeninnervierenden C-Faserneurone konnte gezeigt werden, dass diese sowohl im Ggl. jugulare als auch im Ggl. nodosum lokalisiert sind (Undem et al., 2004; Ricco et al., 1996). Die Segmenthöhe der retrograd markierten lungeninnervierenden DRGs ist abhängig von der Seite der Markierung. Bei Injektion in die linke Lunge werden die Segmente T1-T7 markiert, bei der rechten Seite die Segmente T1-T3 (Springall et al., 1987). Von den vagalen Ggll. aus wird die Information aus der Lunge oder der Trachea jeweils nach zentral zum Ncl. tractus solitarii und zum Ncl. paratrigeminale in der Medulla oblongata weitergeleitet. Dabei projiziert das Ggl. nodosum vor allem auf den Ncl. tractus solitarii und das Ggl. jugulare vor allem auf den Ncl. paratrigeminale (Driessen et al., 2015; McGovern et al., 2015).

1.4 Atemwegshyperreagibilität

Ein Charakteristikum des Asthma bronchiale ist die AHR. Sie bezeichnet eine übersteigerte Reaktionsbereitschaft der Atemwege auf zahlreiche Umweltirritantien. Die Hyperreagibilität kann bei 15% der Erwachsenen nachgewiesen werden, wobei nur 5% an manifestem Asthma leiden (Herold, 2013). Klinisch wird die AHR durch einen Provokationstest, meist mit Methacholin untersucht. Methacholin wird zusammen mit Histamin als direkter Stimulus der AHR bezeichnet, weil beide Stoffe direkt an H1- bzw. muskarinische Rezeptoren auf den glatten Muskeln der Atemwege binden. Von ihnen werden die indirekten Stimuli, wie Anstrengung, Hyperventilation, kalte Luft und einige osmotisch wirksame Stoffe wie Mannitol usw. unterschieden, die über die Freisetzung von Mediatoren und Neurotransmittern aus Entzündungszellen, wie z.B. Mastzellen, aus Nervenzellen oder bronchialen Epithelzellen agieren (Van Schoor et al., 2005).
Es konnte beobachtet werden, dass die Entwicklung der AHR und die Spätphasereaktion (LAR) mit der Atemwegsinflammation zusammenhängen, da beide Phänomene durch die Depletion von Granulozyten unterdrückt werden konnten

(Murphy et al., 1986). Zudem konnte gezeigt werden, dass zur Entwicklung einer allergischen AHR bzw. der AHR-bedingten Bronchokonstriktion eine Innervation durch sensible Neurone notwendig ist. Die Stimulation dieser Neurone durch CPS-Injektionen führte in Lungen von Tieren mit einer allergischen Atemwegsinflammation zu einer dramatisch vermehrten Atemwegsreaktion mit stark erhöhten Atemwegswiderständen auf einen Reiz mit ACh, während bei gesunden Tieren kein Unterschied feststellbar war (Tränkner et al., 2014). In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass die alleinige Ausschaltung der vagalen Neurone auch ohne eine Veränderung der Innervation durch die DRGs eine Unterbindung der AHR-bedingten Bronchokonstriktion bewirkte. Die pharmakologische oder optogenetische Aktivierung der Neurone führte bei Tieren, die gegen OVA sensibilisiert wurden, zu einer Verstärkung der AHR (Tränkner et al., 2014).

In einigen Veröffentlichungen wird vermutet, dass die Ionenkanäle aus der *transient receptor potential* (TRP) Familie eine wichtige Rolle in der Entwicklung der AHR spielen. Begründet wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass viele Agonisten der TRP-Kanäle zu den unspezifischen Umweltiritanzien gehören, auf die Asthmatiker überreagieren können, z.B. kalte und warme Luft, Zigarettenrauch, Chlor, Ozon usw. (Andrè et al., 2008; Bautista et al., 2006; Taylor-Clark & Undem, 2010; Bessac et al., 2008; Story et al., 2003; Caterina et al., 1997). Unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis der Co-Expression von *transient receptor potential cation channel vanilloid 1* (TRPV1) und *transient receptor potential cation channel ankyrin 1 (*TRPA1) auf Neuronen, die die Atemwege sensibel innervieren (Nassenstein et al., 2008) und die vermehrte Expression von TRPV1 in Bronchialbiopsien von Asthmatikern (Butler et al., 2010). Versuche mit TRPA1 knock-out Mäusen konnten zudem zeigen, dass die Mäuse ohne die Expression von TRPA1-Rezeptoren auch keine AHR entwickelten (Caceres et al., 2009). Diese Ergebnisse lenken das Interesse auf die TRP-Rezeptoren als mögliche Vermittler der AHR.

1.4.1 TRP-Rezeptoren

Die Familie der TRP-Kanäle besteht aus mehr als 20 Kanälen in 7 Subgruppen: TRPC (*canonical*), TRPM (*melastatin*), TRPV (*vanilloid*), TRPA (*ankyrin*), TRPN, (NOMPC; *no mechanoreceptor potential*), TRPML (*mucolipidin*) und TRPP (*polycystin*) (Montell, Birnbaumer, & Flockerzi, 2002; Pedersen, Owsianik, & Nilius, 2005). Alle TRP-Kanäle haben 6 transmembranäre Domänen, die zu Homo- oder Heterotetrameren zusammengefügt sind und kationenselektive Kanäle bilden. Die Durchlässigkeit für verschiedene Kationen ist zwischen den einzelnen Kanälen sehr unterschiedlich (Pedersen et al., 2005). Einige TRP-Kanäle tragen zur Änderung des intrazellulären

Calciums bei, indem sie die Bewegung von extrazellulärem Calcium nach intrazellulär ermöglichen, die treibende Kraft zum Calciumeinstrom verändern und wahrscheinlich auch, indem sie Möglichkeiten zur Freisetzung von Calcium aus den Zellorganellen bereitstellen (Pedersen et al., 2005).

Eine besondere Relevanz für die Physiologie der TRPV1 exprimierenden, bronchopulmonalen C-Faserneurone wird TRPA1 zugesprochen (Nassenstein et al., 2008). Der Grund dafür ist die Tatsache, dass sich C-Faserneurone vielfach durch bestimmte Stimuli aktivieren lassen, die mit den beiden TRP-Rezeptoren interagieren. In *single neuron RT-PCRs* konnte gezeigt werden, dass diese Ionenkanäle in vagalen bronchopulmonalen C-Faserneuronen co-exprimiert werden (Nassenstein et al., 2008).

1.4.1.1 TRPV1

Innerhalb der TRPV-Subfamilie wurden bisher 6 Kanäle beschrieben. Diese wurden mit TRPV1-TRPV6 bezeichnet. In der TRPA-Subgruppe ist hingegen nur ein Mitglied bekannt, das als TRPA1 bezeichnet wird. (Montell et al., 2002a; Pedersen et al., 2005). Der erste Kanal der TRPV-Subfamilie, TRPV1, wird durch ein breites Spektrum von endogenen und exogenen Stimuli aktiviert. Dazu gehören exogene Aktivatoren wie z.B. das Vanilloid CPS, ein Alkaloid aus der Chili-Schote, das namensgebend war. Temperaturanstiege über 42°C (Caterina et al., 1997) sowie der endogene Agonist Anandamid, der auch an endogene Cannabinoid-Rezeptoren bindet (Zygmunt et al., 1999), aktivieren TRPV1 ebenfalls. Aufgrund der hochselektiven TRPV1-Expression und dadurch bedingten selektiven Aktivierung der C-Faserneurone durch CPS kann TRPV1 als Marker zur Detektion von nozizeptiven Neuronen angesehen werden (Fox et al., 1993; Caterina et al., 1997).

Die Sensibilität von TRPV1 wird durch verschiedene Stoffe moduliert, z.B durch Bradykinin. Bradykinin bindet an einen G-Protein gekoppelten B_2-Rezeptor und stimuliert so die Phospholipase-C-(PLC)-katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG führt im Weiteren zur Aktivierung der Proteinkinase-C (PKC) (Herdegen, 2008). Durch die PKC wird TRPV1 phosphoryliert (Bhave et al., 2003; Chuang et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Senkung der PIP_2-Konzentration durch Bindung mittels Antikörper oder durch Hydrolyse zu DAG und IP_3 in *voltage-clamp* Versuchen eine gleichartige Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors gegenüber einem CPS-Stimulus wie die Applikation von Bradykinin bewirkt (Chuang et al., 2001). Die Sensibilität von TRPV1 wird zudem durch Stoffe, die bei Entzündungen oder Ischämien in ihrer Konzentration verändert sind, wie z.B. Protonen, gesteigert (Tominaga et al., 1998; Davis et al., 2000). Allerdings können beispielsweise

erhöhte Mengen an Protonen bzw. niedrige pH Werte alleine die TRP-Kanäle nicht aktivieren, aber eine deutlich stärkere Antwort auf eine Stimulation mit CPS bewirken (Caterina et al., 1997). Daher ist die Funktion des TRPV1 bei der Entstehung der allergischen Atemwegsinflammation von besonderem Interesse.

1.4.1.2 TRPA1

TRPA1 wurde 2003 erstmals als ein Rezeptor für kalte Temperaturen beschrieben. Da TRPA1 nicht in myelinisierten Neuronen nachweisbar war, wurde schon damals vermutet, dass der Rezeptor in unmyelinisierten C-Faserneuronen exprimiert wird (Story et al., 2003). TRPA1 wird zusammen mit TRPV1 in bronchopulmonalen C-Faserneuronen co-exprimiert und sensibilisiert sie für bestimmte Irritantien (Nassenstein et al., 2008; Caceres et al., 2009). Von den TRPA1 exprimierenden Neuronen exprimierten 97% auch TRPV1, während 30% der TRPV1 exprimierenden Neurone auch TRPA1 exprimieren (Story et al., 2003). Grundsätzlich kann TRPA1 durch verschiedene Stimuli aktiviert werden, z.B. Zigarettenrauch und das in ihm enthaltene Acrolein und Crotonaldehyd, sowie Chlor, Ozon, Senföl, Zimtaldehyd und Kälte. Viele dieser Substanzen können bei Asthmatikern zu Asthmaanfällen führen (Andrè et al., 2008; Bautista et al., 2006; Bessac et al., 2008; Story et al., 2003; Taylor-Clark & Undem, 2010). Zur Aktivierung der TRPA1 mittels Kälte bedarf es deutlich niedrigere Temperaturen als bei den TRPM8 Rezeptoren, wobei die Grenzwerte je nach Zelle zwischen 8 und 28°C schwankten. Als Richtwert werden Temperaturen unter 17 °C angegeben (Story et al., 2003). Neben exogenen Stimuli können auch endogene Agonisten, wie z.B. reaktive Sauerstoffspezies, Isoprostane und Nonenale, die beide als Oxidationsprodukte im Arachidonsäurestoffwechsel auftreten, TRPA1 aktivieren (Trevisani et al., 2007; Taylor-Clark et al., 2008; Taylor-Clark & Undem, 2010; Undem & Nassenstein, 2009). Auch endogene Produkte wie 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2), ein Metabolit des Prostaglandin D2, der bei allergischer Atemwegsinflammation gehäuft vorkommt, aktivieren TRPA1 (Nowak et al., 1993; Taylor-Clark et al., 2008).

Eine genetische Ausschaltung des TRPA1-Rezeptors, wie bei TRPA1 knock-out Mäusen, oder die pharmakologische Inhibition mit dem TRPA1-Antagonisten HC-030031, führte zu einer eingeschränkten Reaktion des Immunsystems auf die Stimulation mit einem Allergen. Dabei kam es bei diesen Mäusen zu einer reduzierten allergeninduzierten Zytokin- und Schleimproduktion, vor allem der Zytokine, die von TH2-Zellen sezerniert werden. Zudem war die Infiltration der Atemwege durch Leukozyten, wie z.B. Eosinophile, reduziert. Die TRPA1 knock-out Mäuse bzw. die Mäuse, die mit dem TRPA1-Antagonisten behandelt wurden, wiesen Defizite in der

allergeninduzierten Neuropeptidproduktion bzw. Freisetzung in den Atemwegen auf. Außerdem war die Hyperreaktivität gegenüber Stimulantien, die zur Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur führten, bei diesen Mäusen nahezu aufgehoben (Caceres et al., 2009).

Zusammenfassend stellen sowohl TRPV1 als auch TRPA1 sehr wichtige Rezeptoren der bronchopulmonalen C-Faserneurone dar, die möglicherweise eine relevante Rolle in der Entstehung der AHR bei Patienten mit Asthma bronchiale spielen. Daher ist es von Interesse, potentielle Einflussfaktoren auf diese Rezeptoren zu untersuchen. Ein möglicher Einflussfaktor ist die *glial cell line derived neurotrophic factor family of ligands* (GFLs).

1.5 Glial cell line derived neurotrophic factors

Die GFLs sind neben den Neurotrophinen und der *ciliary neurotophic factor* Familie (CNTF) die am besten beschriebenen Gruppe von Wachstumsfaktoren für Neurone und Zellen der Neuralleiste (Butte, 2001). Die GFLs sind eine Gruppe von vier Proteinen. Der *glial cell line derived neurotrophic factor* (GDNF) wurde 1993 erstmalig beschrieben und war daher namensgebend (Lin et al., 1993), es folgte das strukturähnliche Neurturin (Kotzbauer et al., 1996), 1998 schließlich Artemin (Baloh et al., 1998b) und Persephin (Milbrandt et al., 1998). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit gehören die GFLs in die Gruppe der *transforming growth factor-β*-(TGFβ)-Superfamilie, da sie alle ein gleiches Muster aus 7 Cysteinen in immer nahezu gleichen Abständen aufweisen (Cystein-Knotenmuster) (Airaksinen & Saarma, 2002; Lin et al., 1993). GFLs werden als Vorstufe (preproGFL) synthetisiert und dann durch proteolytisches Abspalten der Signalsequenz zu einem reifen disulfid-verbundenen Dimer prozessiert, wie es auch bei anderen Mitgliedern der TGFβ-Superfamilie der Fall ist (Lin et al., 1993; Airaksinen & Saarma, 2002).

Im Jahre 2006 wurde der Einfluss der *glial cell line derived neurotrophic factor family of ligands* (GFLs) auf die Sensibilisierung der TRP-Rezeptoren untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sie diese, ähnlich wie Neurotrophine, deutlich erhöhen (Elitt et al., 2006; Malin et al., 2006). In anderen Veröffentlichungen wurde die Rolle der GFLs für die inflammatorische Atemwegserkrankung untersucht. So konnte gezeigt werden, dass Neurturin die Entzündungsantwort und das *airway remodeling* beeinflusst (Michel et al., 2011; Mauffray et al., 2015). Die GFLs konnten im Lungengewebe und ihre Rezeptoren in vagalen lungeninnervierenden afferenten Neuronen nachgewiesen werden (Nassenstein et al., 2010; Baloh et al., 1998b; Lindahl et al., 2001; Trupp et al., 1995; Widenfalk et al., 1997). Daher soll den GFLs im Folgenden besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

1.5.1 GDNF

GDNF wurde erstmals aus der Glia-Zelllinie B49 von Ratten isoliert. Es ist ein N-glykosiliertes, über Disulfide verbundenes Dimer mit einer Molekularmasse zwischen 32 und 42 kDa bzw. 18-22 kDa in reduzierenden Gelen, die die Disulfidbrücken aufbrechen (Lin et al., 1993). Durch eine Deglykosylierung mittels N-Glykanase konnte im Versuch das Molekulargewicht von ca. 20 kDa auf ca. 15 kDa gesenkt werden (Lin et al., 1993). Sequenzierungsdaten weisen darauf hin, dass GDNF als Vorstufe synthetisiert wird, prozessiert und als reifes Molekül von 134 Aminosäuren sezerniert wird (Lin et al., 1993). Durch alternatives Spleißen kommt es zu zwei verschiedenen Transkriptionsvarianten, α-Pro-GDNF und die 78 Basenpaare kürzere Variante β-Pro-GDNF, die in verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Maße exprimiert werden (Suter-Crazzolara & Unsicker, 1994).

Rekombinantes humanes GDNF kann in Kulturen von embryonalen Mittelhirnen das Überleben und die morphologische Differenzierung von dopaminergen Neuronen unterstützen, zusätzlich erhöht es die hochaffine Dopaminaufnahme. Das macht es unter anderem zu einem interessanten Zielprotein in der Parkinson-Therapie (Lin et al., 1993). In jüngeren Versuchen wurde die wichtige Rolle von GDNF in der Leitung, Differenzierung und dem Überleben von pulmonalen Neuronen während der Entwicklung nachgewiesen. Im *in vitro* Versuch konnte durch die immunhistochemische Markierung mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker *protein gene product* (PGP) 9.5 gezeigt werden, dass GDNF eine signifikante Hyperinnervation der Atemwege bewirkt und eine chemotaktische Wirkung auf die pulmonalen Neuronenvorstufen hat und so die Richtung des Neuritenwachstums beeinflusst (Tollet et al., 2002). Bei Versuchen mit GDNF knock-out Mäusen konnten Verluste von sensorischen Neuronen in den DRGs, im Ggl. nodosum, Ggl. petrosum sowie von sympathischen Neuronen im SCG nachgewiesen werden. Außerdem litten diese Mäuse an einem fehlenden enterischen Nervensystem (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sánchez et al., 1996). Die Versuche mit GDNF knock-out Mäusen zeigten zudem, dass GDNF auch außerhalb des Nervensystems verschiedene Funktionen wahrnimmt. Homozygote GDNF knock-out Mäuse starben bereits 1-1,5 Tage nach ihrer Geburt (Moore et al., 1996). Heterozygote GDNF knock-out Mäuse litten an einer Verarmung an Spermatogonien, während männliche Mäuse, die GDNF überexprimierten, infertil waren (Meng et al., 2000). Die knock-out Mäuse litten zudem an einer fehlenden oder fehlgebildeten Nierenanlage, sowie einer mangelhaften Ureterknospung und –verzweigung (Moore et al., 1996; Pichel et al., 1996; Sánchez et al., 1996).

1.5.2 Neurturin

Neurturin ist ein 25 kDa schweres Protein mit großer Ähnlichkeit zu GDNF. Die Aminosäuresequenz ist zu 42% homolog zu der von reifem GDNF, während sie zu anderen Mitgliedern der TGFβ-Superfamilie weniger als 20% beträgt. Neurturin wurde bei der Entwicklung eines Systems zur Produktion rekombinanter Wachstumsfaktoren entdeckt, da beobachtet wurde, dass ein Stoff in den Medien von Ovarialzellen chinesischer Hamster das Langzeitüberleben von Neuronen des SCG unterstützte. Neurturin unterstützt wie GDNF das Überleben von Zellen des Ggl. nodosum und einer kleinen Population von Zellen aus dem DRG (Kotzbauer et al., 1996). Im Gegensatz zu GDNF knock-out Mäusen haben Neurturin knock-out Mäuse eine normale Nierenfunktion, die Funktion des enterischen Nervensystems ist jedoch ebenfalls eingeschränkt, genau wie die parasympathische Innervation der Speichel- und Tränendrüsen (Heuckeroth et al., 1999). Neuere Versuche zeigten, dass Milz-Zellen von sensibilisierten Neurturin knock-out Mäusen im Vergleich zu Milz-Zellen von sensibilisierten Wildtyp-Mäusen eine erhöhte IL-4- sowie eine leicht erhöhte IL-5- und IL-13-Synthese aufwiesen und nach Allergen-Sensibilisierung höhere IgE-Spiegel zeigten als die sensibilisierten Wildtyp-Mäuse. Die gleiche Tendenz zeigten die IL-4-, IL-5- und IL-13-Spiegel dieser Mäuse in der BALF. Zusätzlich konnte eine vermehrte Gewebsinfiltration durch Eosinophile und Neutrophile und Veränderungen im subepithelialen Kollagen im Sinne eines *airway remodeling* nachgewiesen werden (Mauffray et al., 2015). Des weiteren reagieren Neurturin knock-out Mäuse auf eine Methacholin-Provokation mit einer stärkeren Erhöhung des Atemwegswiderstandes als die Wildtyp-Mäuse (Michel et al., 2011). Diese Ergebnisse machen Neurturin zu einem interessanten Zielprotein für die Asthmatherapie.

1.5.3 Artemin

Artemin wurde aufgrund seiner Strukturhomologie als weiteres Mitglied der GFLs identifiziert. Artemin konnte in embyologischem und adultem Gewebe nachgewiesen werden. Die höchsten mRNA-Level waren in Plazenta, Trachea und Hypophyse zu finden. In den fetalen Geweben wurde Artemin in Lunge und Niere am stärksten exprimiert. In Gehirn und Rückenmark hingegen wurde kaum Artemin-mRNA exprimiert (Baloh et al., 1998b). Eine Studie mit Mäusen, die Artemin überexprimieren, zeigte, dass Artemin die Anzahl der sensiblen Neurone in peripheren Ggll. und die Dichte der GFRα3-Rezeptoren in DRG-Neuronen erhöht. Außerdem führt Artemin zu einer Überexpression von TRPV1- und TRPA1-mRNA in DRGs (Elitt et al., 2006). In einem Calcium-Imaging-Versuch konnte Artemin unter allen 4 GFLs die Sensibilität von TRPV1 am effizientesten steigern (Malin et al., 2006).

1.5.4 Persephin

Persephin entspricht zu ca. 40% der Aminosäurensequenz von GDNF und Neurturin. Wie GDNF und Neurturin fördert es das Überleben von dopaminergen Neuronen aus dem ventralen Mittelhirn und von Motorneuronen *in vivo* und *in vitro* nach Axotomie des N. ischiadicus. Wie GDNF unterstützt es außerdem die Aussprossung der Ureteren. Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der GFLs konnte kein positiver Einfluss von Persephin auf das Überleben der Neurone in peripheren Ggll., wie SCG, DRG, Ggl. nodosum, Ggl. trigeminale und enterische Ggll., festgestellt werden (Milbrandt et al., 1998).

1.5.5 Rezeptoren der GFLs

Die Bindung der GFLs (Dimere) erfolgt an die ligandenspezifischen *GDNF family receptor α* (GFRα)-Rezeptoren. Dieser GFL-GFRα Komplex bindet anschließend an den extrazellulären Teil des *rearranged during transfection* (RET)-Rezeptors und bildet so einen Heterohexamer-Komplex. Dies führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne von RET (Sariola & Saarma, 2003; Airaksinen et al., 1999; Jing et al., 1996, 1997; Baloh et al., 1998b; Lindahl et al., 2001). Dadurch werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden, die Einfluss auf Überleben, Differenzierung, Proliferation, synaptische Plastizität und neuronales Wachstum haben, aktiviert. Unter anderem aktiviert RET die Phospholipase Cγ (PLCγ)-Signalkaskade und führt so zur Erhöhung von IP_3, das durch die Wirkung am IP_3-Rezeptor zu einer Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum führt und so den intrazellulären Calciumspiegel steigert (Sariola & Saarma, 2003; Löffler & Petrides, 2007). Der Tyrosinkinaserezeptor RET ist der Rezeptor für alle vier GFLs. Er wurde 1986 durch die Transfektion von Zellen einer embryonalen Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie (NIH 3T3) mit der DNA von humanen T-Zell-Lymphomen entdeckt. Er zeigt 40-50% Homologie zu Mitgliedern der Tyrosinkinase-Familie, wie ros, abl, src, fms, fps, dem humanen Insulinrezeptor und dem humanem *epidermal growth factor*-Rezeptor (Takahashi & Cooper, 1987). Die RET-mRNA ist in fast allen adulten Geweben nachweisbar. Besonders stark ist die RET-Expression im adulten Gehirn, im Kleinhirn, im Rückenmark, in den Speicheldrüsen, in der Nebenniere und der Prostata. Aber auch in der Schilddrüse, im Thymus, im Gastrointestinaltrakt, in der Leber und der Trachea ist RET nachweisbar. Relativ geringe Expressionslevel wurden in Milz, Lunge und Niere gefunden (Lindahl et al., 2001).

Die GFRα-Rezeptoren sind über Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Plasmamembran gebunden (Jing et al., 1996). Sie zeichnen sich durch eine ähnliche Aminosäuresequenz mit Homologien in drei Cystein-reichen Sequenzen aus. In ihrer Struktur werden die drei Cystein-reichen Domänen durch weniger erhaltene Adaptersequenzen verbunden (Airaksinen et al., 1999). Dem Persephin-Rezeptor GFRα4 fehlt die erste dieser Cystein-reichen Domänen (Lindahl et al., 2001) (Abbildung 1).

.

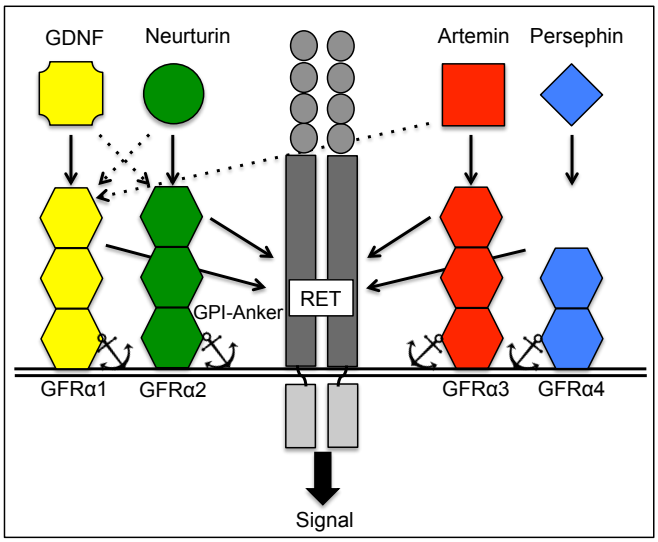

Abbildung 1**: Schema zur Bindung der GFLs an ihre Rezeptoren, angelehnt an (Airaksinen & Saarma, 2002).**
Jedes GFL hat einen spezifischen GFRα-Rezeptor. GDNF bindet an GFRα1, Neurturin an GFRα2, Artemin an GFRα3 und Persephin an GFRα4 (durchgezogene Pfeile = hohe Affinität). Zusätzlich gibt es Kreuzreaktivitäten (gestrichelte Pfeile = niedrige Affinität). Neurturin und Artemin können zusätzlich an GFRα1 binden und GDNF kann GFRα2 binden. Die Sechsecke stellen die konservierten Cystein-reichen Domänen dar.

Jedes Mitglied der GFLs bindet besonders effizient an einen der vier GFRα-Rezeptoren. Zusätzlich kommt es zum Teil zu Bindungen bestimmter GFLs an den präferierten Rezeptor eines anderen GFLs. Der hochaffine Rezeptor für GDNF ist GFRα1. Dies konnte 1996 durch Versuche gezeigt werden, in denen Zellen, die mit rekombinantem GFRα1 transfiziert wurden, GDNF dosisabhängig banden. In Zellen, die selbst GFRα1 exprimierten, stimulierte GDNF die Tyrosinphosphorylierung von RET. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch lösliche GFRα1-Rezeptoren zusammen mit GDNF die Autophosphorylierung von RET induzieren (Jing et al., 1996). Neben GDNF können auch Neurturin und Artemin mit geringerer Affinität an GFRα1 binden (Jing et al., 1997; Baloh et al., 1998b). GFRα1 wird in vielen Geweben exprimiert. In adulten Ratten konnte eine starke Expression in Lunge, Leber, Gehirn, Niere und Milz und eine etwas schwächere Expression im Herzen nachgewiesen werden. Dabei können zwei Transkriptvarianten unterschieden werden. Das kleinere Transkript ist 3,6 kb groß und wird vor allem in Leber, Lunge Herz und Milz exprimiert, während in Gehirn und Niere sowohl das 3,6 kb als auch das 8,5 kb große Transkript exprimiert werden. In Muskel und Hoden war der Rezeptor nicht nachweisbar (Jing et al., 1997). Während der Entwicklung (E18) wird GFRα1 am stärksten in der Leber und nur schwach in Gehirn und Haut exprimiert (Thompson et al., 1998).

Der hochaffine Rezeptor für Neurturin ist GFRα2, er kann auch GDNF binden, jedoch mit einer etwas geringeren Affinität (Klein et al., 1997; Baloh et al., 1997; Jing et al., 1997). Die Expression des Rezeptors ist in Lunge, Milz und Gehirn im Vergleich zu den anderen untersuchten Organen wie Leber, Muskel und Hoden am größten, auch in der Niere und in geringeren Mengen im Herzen wird GFRα2 exprimiert. Das Expressionmuster bei adulten Ratten ähnelt damit sehr dem von GFRα1, mit dem Unterschied, dass GFRα2 nicht in der Leber exprimiert wird. Auch die Größe des Transkripts für GFRα2 ist mit 3,6 kb genauso groß wie die kleinere Variante des GFRα1-Transkripts (Jing et al., 1997).

GFRα3 ist der spezifische Rezeptor für Artemin und wurde bereits ein Jahr vor seinem Liganden identifiziert (Jing et al., 1997; Baloh et al., 1998b). Der Rezeptor wird sehr stark in der Niere exprimiert. Er konnte auch in Lunge, Milz, Leber und Herz, aber nicht im Gehirn nachgewiesen werden (Jing et al., 1997).

GFRα4 wurde 1998 aufgrund der Ähnlichkeit seiner Aminosäuresequenz zu der von GFRα1 und GFRα2 durch die Untersuchung einer cDNA-Bibliothek eines Gehirns vom Hühnerembryo gefunden (Thompson et al., 1998). Der GFRα4/RET-Komplex wird nur von Persephin gebunden und aktiviert (Lindahl et al., 2001). Darüber hinaus ist Persephin nicht in der Lage, GFRα1, GFRα2 oder GFRα3 zu aktivieren (Milbrandt et al., 1998; Baloh et al., 1998a; Enokido et al., 1998). GFRα4 wird in der adulten Maus vor allem in endokrinen Drüsen wie der Nebenniere, den C-Zellen der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse und der Hypophyse exprimiert. Außerdem wird der Rezeptor in unterschiedlicher Expressionsstärke in bestimmten Hirnregionen und in den Hoden exprimiert. In Niere, Lunge und Leber war keine GFRα4-Expression nachweisbar (Lindahl et al., 2000).

1.5.5.1 Weitere Rezeptoren der GFLs

An Stelle von RET kann auch das *neural cell adhesion molecule* (NCAM) als alternativer Rezeptor für die Signaltransduktion der GFLs fungieren. Die Verbindung von NCAM und GFRα1 fördert die Bindung von GDNF an eine Isoform des NCAM, was in Zellen, die RET nicht exprimieren, zu einer Aktivierung der Tyrosinkinasen Fyn und FAK führt (Paratcha et al., 2003). GDNF, Neurturin und Artemin interagieren zudem mit dem Heparansulfat-Proteoglycan Syndecan 3, wenn sie an die Matrix der Zelle gebunden sind. Dabei kann GDNF direkt an Syndecan 3 binden, ohne an GFRα1 zu binden. Der GFL-Syndecan 3-Komplex führt zum Auswachsen von Zellen, die RET nicht exprimieren, und Neuriten, die sehr wenig RET exprimieren (Bespalov et al., 2011).

1.5.5.2 Expression der GFL-Rezeptoren im Ggl. jugulare/nodosum

Der GDNF-Rezeptor GFRα1 wird nicht nur in den Neuronen des Ggl. nodosum, sondern auch in einer non-peptidergen Subpopulation der Neurone aus dem Ggl. jugulare exprimiert, während der Artemin-Rezeptor GFRα3 nur in einer peptidergen Subpopulation der Neuralleisten-Neurone des Ggl. jugulare exprimiert wird. Der Neurturin-Rezeptor GFRα2 und der Persephin-Rezeptor GFRα4 wurden jeweils in nur 2/15 lungeninnervierenden Neuronen der Neuralleiste exprimiert. In den Neuronen mit plakodalem embryologischem Ursprung wurde GFRα2 in 15/56 und GFRα4 in 28/56 Neuronen exprimiert. Alle lungeninnervierenden Neurone der Neuralleiste exprimierten RET (Nassenstein et al., 2010).

Die Tatsache, dass GFL-Rezeptoren von atemwegsinnervierenden Neuronen exprimiert werden, macht deutlich, dass die GFLs als Liganden dieser Rezeptoren möglicherweise eine hohe Relevanz für die Innervation der Atemwege haben. Dies könnte bedeuten, dass eine Veränderung der GFL-Expression zur Entwicklung einer AHR beim Asthma bronchiale beitragen könnte.

1.6 Fragestellung/Hypothese

Ein Asthmaanfall äußert sich durch heftige Symptome wie anfallsartige Atemnot, Brustenge, Reizhusten und eine verlängerte Exspiration mit einem pfeifenden Atemgeräusch. Diesen Symptomen liegt eine motorische Innervation der Atemwege zugrunde, die als Reflexantwort auf eine afferente Information durch einen Reiz der Atemwege angesehen werden kann (Undem & Carr, 2002). Häufig lösen bestimmte Umweltirritantien diesen Reiz aus, die zudem in der Lage sind, TRPA1- und TRPV1-Rezeptoren zu aktivieren, wie kalte und warme Luft, Zigarettenrauch, Chlor und Ozon (Bautista et al., 2006; Andrè et al., 2008; Bessac et al., 2008; Story et al., 2003; Caterina et al., 1997; Taylor-Clark & Undem, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass TRPV1-Rezeptoren in Bronchialbiopsien von Asthmatikern verstärkt exprimiert werden (Butler et al., 2010) und TRPV1- und TRPA1- Rezeptoren auf C-Faserneuronen co-exprimiert werden (Nassenstein et al., 2008). Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse wird vermutet, dass die sensible Innervation der Lungen durch C-Faserneurone, die diese Rezeptoren exprimieren, eine große Rolle in der Pathogenese der allergischen Atemwegsinflammation spielen könnte.

Daher soll in dieser Arbeit der Fokus auf die TRP-Rezeptoren auf C-Faserneuronen und die Faktoren, die sie potentiell beeinflussen, gerichtet werden. Als möglicher Einflussfaktor auf die inflammatorische Atemwegserkrankung wird die Familie der GFLs diskutiert, Die GFLs konnten in der Lunge und ihre Rezeptoren RET und GFRα1-4 in vagalen lungeninnervierenden, afferenten Nerven nachgewiesen werden

(Nassenstein et al., 2010; Baloh et al., 1998b; Lindahl et al., 2001; Trupp et al., 1995; Widenfalk et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Reizbarkeit der TRP-Rezeptoren durch den Einfluss der GFLs, ähnlich wie durch Neurotrophine, deutlich erhöht wird (Elitt et al., 2006; Malin et al., 2006).

Die Hypothese, die in dieser Arbeit untersucht wird lautet: Die Expression und/oder Funktion der GFLs ist bei allergischer Atemwegsentzündung verändert, so dass es über die Beeinflussung der C-Faserneurone und der auf ihnen exprimierten TRP-Rezeptoren, TRPV1 und TRPA1, zu einer erhöhten Sensibilität für unspezifische Umweltirritantien kommt. Die veränderte Sensibilität führt dann wiederum möglicherweise zu einer vermehrten, zentralen Auslösung der asthmatypischen Symptome wie Husten, Bronchokonstriktion und muköser Hypersekretion (Abbildung 2).

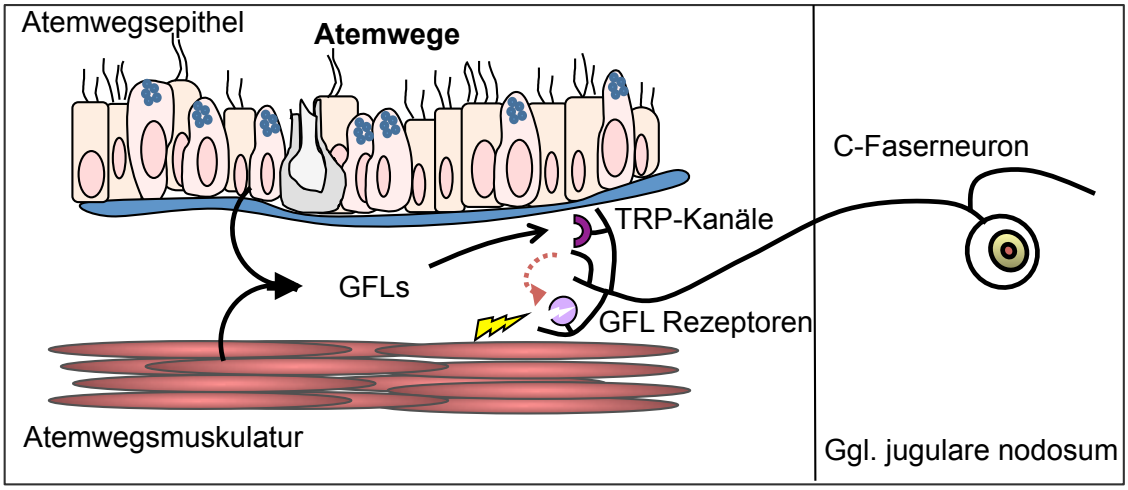

Abbildung 2: **Schematische Darstellung der Arbeitshypothese.**
Die GFL-Expression in den Atemwegen ist bei allergischer Atemwegsentzündung verändert und beeinflusst vor Ort die auf den C-Faserneuronen lokalisierten TRP-Kanäle und die C-Faserneurone selbst. Dadurch kommt es zu einer Sensibilisierung der afferenten Informationsweitergabe von den Atemwegen ans ZNS und in der Folge zu einer überschießenden motorischen Antwort auf eine Reizung der Atemwege in Form eines Asthmaanfalles.

Folgende Fragestellungen sollen dazu in der Arbeit geklärt werden:

1. Werden GFLs im Respirationstrakt der Maus exprimiert?
2. Welche Gewebe oder Zellen synthetisieren die GFLs?
3. Ist die Expression der GFLs bei Tieren mit einer allergischen Atemwegsentzündung verändert und zu welchen funktionellen Konsequenzen führt dies?

2 Material und Methode

2.1 Verwendete Geräte

- Analysewaage R200D, Sartorius AG, Göttingen, D
- Cellstar Tubes (15 ml, 50 ml), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
- Deckgläser (24×60 mm, 0,13-0,17 mm Dicke), R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Direct-Q, Reinstwasseraufbereitungssystem, Millipore Corporation, Billerica, USA
- Einmalspritzen (1 ml, 5 ml), Braun, Melsungen, D
- Kugelmühle Retsch MM300, Retsch, Haan, D
- Magnetrührer, IKA, Staufen, D
- Metallkugeln für die Kugelmühle, Retsch, Haan, D
- Mini-Zentrifuge Sprout, Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, D
- Objektträger (25×75×1 mm), R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Pipetboy mini, INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D
- Pipetten, Pipetman (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Gilson, Middleton, USA
- Purple Nitrile-Xtra Handschuhe, Kimberley-Clark, Dallas, USA
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml), Eppendorf AG, Hamburg, D
- Sterile Einwegkanülen, Braun, Melsungen, D
- TipOne Filterspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), STARLAB, Hamburg, D
- Venenverweilkanülen, Braun, Melsungen, D
- Vortex MS2 Minishaker, IKA, Staufen, D
- Waage MXX-612, Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
- Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.2 Verwendete Chemikalien

- Ampuwa, Fresenius Kabi Gmbh, Bad Homburg, D
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Glukose, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D
- Glycerol, Merck, Darmstadt, D
- Methanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, D
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$), Merck, Darmstadt, D
- TissueTek O.C.T Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL
- TRIS, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D

2.3 Tierhaltung

Für alle Versuche wurden zwischen 6 und 8 Wochen alte C57Bl/6 Mäuse verwendet, die im Zentralen Tierlabor und im Biomedizinischen Forschungszentrum der Universität Gießen gezüchtet wurden. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen von 22 °C (± 2 °C), einer Luftfeuchtigkeit von 55% (± 1%) in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Ovalbumin-freies Futter und Wasser *ad libitum*.
Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen V54–19c20-15 (1) GI 20/23 Nr. 37/2010 und V54-19c20 15h 01 GI 20/23 Nr. 29/2013).

2.3.1 Behandlungsprotokoll zur Induktion einer Atemwegsinflammation

Material:

- $Al(OH)_3$ Alum Injekt, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Discofix 3 Wegehähne, Braun, Melsungen, D
- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories, Pasching, Österreich
- Medap Sekretsauger P7010, Maquet GmbH, Rastatt, D
- Ovalbumin Grad V/VI, Sigma Aldrich, St. Louis, USA
- Vernebler PARI LC STAR, PARI GmbH, Starnberg, D

Für die vergleichenden Untersuchungen wurde eine gesunde Kontrollgruppe („PBS-Gruppe") mit einer Gruppe von Tieren mit bronchopulmonaler Inflammation („OVA-Gruppe") miteinander verglichen. Die Tiere beider Gruppen bekamen an Tag 0, 14 und 21 des Protokolls intraperitoneal je 200 µl verdünntes Ovalbumin (OVA; 10 µg Ovalbumin Grad VI an 1,5 mg $Al(OH)_3$ absorbiert, in 200 µl PBS) injiziert.
An den Tagen 27, 28 und 35 wurden die Tiere für 20 min entweder einem Aerosol aus Ovalbumin (1% OVA Grad V in PBS; OVA-Gruppe) oder zur Kontrolle nur PBS-Puffer ausgesetzt (PBS-Gruppe) (siehe
Abbildung 3) Die Substanzen wurden mittels eines Inhalators in ca. 1 µm große, atemwegsgängige Tröpfchen vernebelt und zu den Tieren in einer luftdichten Plexiglasbox geleitet. Eine Vakuumpumpe erzeugte einen minimalen Unterdruck. Ein – zwischen Vernebler und Kammer geschaltetes – offenes T-Stück gewährleistete den Druckausgleich und damit konstante Luftdruckverhältnisse in der Kammer und verhinderte gleichzeitig ein Austreten des Aerosols nach außen (Abbildung 4).

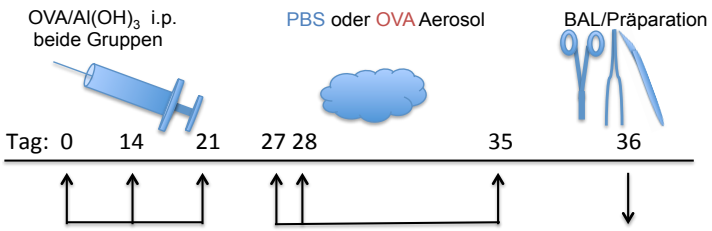

Abbildung 3: **Protokoll zur Induktion einer Atemwegsinflammation.**
i.p. = intraperitoneal, BAL = bronchoalveoläre Lavage.

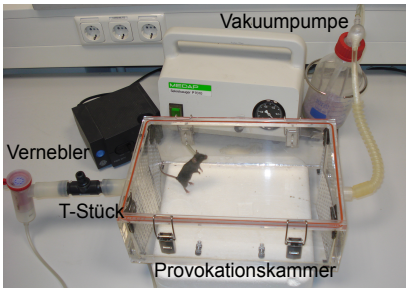

Abbildung 4: **Versuchsaufbau zur Aerosolprovokation.**

2.3.2 Tierschutzkonforme Tötung und Präparation

Material:

- Isofluran, Baxter, Unterschleißheim, D
- 2-Methylbutan, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Präparationsmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

Phosphatpuffer		ml
Lösung A	200 mM NaH_2PO_4x $2H_2O$; Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	230 ml
Lösung B	200 mM Na_2HPO_4x $2H_2O$; Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	770 ml

Tabelle 1: Phosphatpuffer

Einen Tag (24 h) nach der letzten Aerosolprovokation (Tag 36) wurden die Tiere tief betäubt. Dazu wurde ein mit 0,25 ml Isofluran getränkter Wattetupfer in ein 1 l Glas eingebracht und die Maus hineingesetzt. Nach der Überprüfung der ausreichenden Narkosetiefe durch fehlende Abwehrreflexe auf einen Schmerzreiz wurde das Abdomen eröffnet und die Bauchaorta zum Entbluten durchtrennt. Anschließend wurde der Thorax eröffnet. Die Trachea wurde freigelegt und unter dem Mikroskop mittels Venenverweilkanüle kanüliert, sodass eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) (siehe 2.3.3) durchgeführt werden konnte. Die Lungen wurden im Anschluss über die Trachealkanüle mit OCT und 0,1 M Phosphatpuffer (im Verhältnis 1:1) gefüllt. Die Präparation des Ggl. jugulare/nodosum erfolgte, indem der N. vagus paratracheal aufgesucht und bis zur Schädelbasis verfolgt wurde.

2.3.3 Zellzahlbestimmung und Differentialzytologie der bronchoalveolären Lavage

Material:

- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Entellan, Merck, Darmstadt, D
- Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck, Darmstadt, D
- Heraeus Zyto-System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Lichtmikroskop Leica DM IRB, Leica, Wetzlar, D

- May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung, Merck, Darmstadt, D
- Neubauer Zählkammer improved brightlight, Laboroptik, Lancing, England

Zum Nachweis der Atemwegsinflammation dienten die Bestimmung der Gesamtzellzahlen und die Differenzierung der Zellen in der BAL-Flüssigkeit (BALF). Dazu wurde nach der oben beschriebenen Kanülierung der Trachea (siehe 2.3.2) zweimal nacheinander je 0,8 ml PBS in die Lunge appliziert, aspiriert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Die Gesamtzellzahl der BAL wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

Zur Differenzierung der BAL-Zellen wurden zunächst Zytospots angefertigt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension in ein Mikrogefäß mit Bodenloch pipettiert, das auf einem Objektträger fixiert wurde. Die Objektträger wurden 5 min lang bei 500 rpm zentrifugiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch Filterpapierkarten aufgenommen.

Nach dem Trocknen wurden die Zytospots mit einer May-Grünwald-Giemsa-Färbung nach Pappenheim gefärbt. Dazu wurden sie 5 min lang in May-Grünwald-Lösung inkubiert und nach 2 min Waschzeit in PBS-Puffer 15 min lang in Giemsa-Lösung gefärbt. Zum Abschluss wurden die Objektträger in H_2O gewaschen und mit Entellan eingedeckelt.

Anschließend erfolgte die Differenzierung der Leukozyten und die Berechnung der prozentualen Anteile der jeweiligen Subpopulationen an der Gesamtzellzahl.

Es wurden pro Objektträger ca. 600 Zellen beurteilt. Dabei wurden die jeweiligen Zahlen der neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten gezählt. Bei einer 40x Vergrößerung im Durchlichtmikroskop wurden die ca. 20 µm großen Alveolarmakrophagen aufgrund ihres breiten Zytoplasmasaumes und exzentrischen Zellkernes von den nur 4-8 µm großen Lymphozyten mit schmalem Zytoplasmasaum unterschieden. Die ca. 10-15 µm großen neutrophilen Granulozyten unterschieden sich von den gleichgroßen eosinophilen Granulozyten durch ihren Zellkern aus meist 3-5 Segmenten. Die eosinophilen Granulozyten waren vor allem an ihren eosinophilen Vesikeln (in rötlicher Farbe) von den anderen Leukozyten zu unterscheiden.

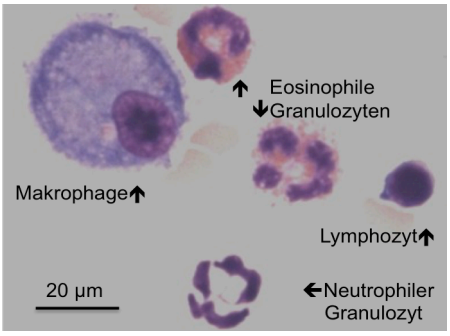

Abbildung 5: **Lichtmikroskopische Aufnahme von Zellen nach May-Grünwald-Giemsa Färbung eines BALF Zytospots.**
Exemplarisch dargestellt sind die 4 zu differenzierenden Zelltypen.

2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

2.4.1 RNA Isolation mit dem RNeasy Mini Plus Kit

Material:

- Bio Rad Photometer, Eppendorf, Hamburg, D
- β-Mercaptoethanol (min 98%), Sigma Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, D
- Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, D
- NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, USA
- Qiashredder, Qiagen, Hilden, D
- RNAlater RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Hilden, D
- RNeasy Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden, D

Zunächst wurde mittels RNeasy Plus Mini Kit die RNA aus dem zu untersuchenden Lungen- und Trachealgewebe isoliert. Das Gewebe wurde mit einer Metallkugel in ein Reaktionsgefäß mit 600 µl RLT Puffer/1% β-Mercaptoethanol gegeben und 5 min lang bei 30 Hz in der Kugelmühle geschüttelt. Das Lysat wurde anschließend abzentrifugiert (3 min, 13000 rpm). Der Überstand wurde auf ein gDNA removal column übertragen und zentrifugiert (1 min, 10000 rpm), wodurch die genomische DNA eliminiert wurde. Der Durchfluss wurde mit 600 µl 70% Ethanol vermischt, auf die RNeasy Mini Spin Column-Säulen gegeben und zentrifugiert (je 1 min, 10000 rpm). Anschließend wurden die Säulen zunächst mit 700 µl des Waschpuffers RW1 (1 min, 10000 rpm) und dann zweimal mit je 500 µl RPE Puffer gewaschen (erst 1 min, dann 2 min je 10000 rpm).
Vor dem Eluieren der RNA wurden die Säulen 1 min lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl H_2O direkt auf die Membran pipettiert und die Säulen 1 min lang bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und der RNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

2.4.2 DNA-Verdau und Reverse Transkription

Material:

- Dithiolthreitol (DTT) (0,1 M), Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- 10× DNase I Reaction Buffer, Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- DNase I (1 U/µl), Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- dNTPs (100 mM), Qiagen, Hilden, D
- EDTA (25 mM, pH 8,0), Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- 5× First Strand Buffer, Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, D
- Oligo dTs (0,5 µg/µl), Qiagen, Hilden, D

- PCR Tube Strips 0,2 ml, Eppendorf, Hamburg, D
- Random Hexamer Primer, Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA
- Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/µl), Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA

Für jede Umschreibung wurde 1 µg RNA eingesetzt. Nach einem DNAse Verdau (15 min, 25 °C) wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 1 µl EDTA beendet und das Enzym denaturiert (10 min, 65 °C). Ein Mastermix zur cDNA Synthese (siehe Tabelle 2) wurde angesetzt. Der Hälfte des Ansatzes wurde Reverse Transkriptase (RT) hinzugefügt (+RT), die andere Hälfte diente als -RT-Kontrolle (-RT). Hier wurde die RT durch H_2O ersetzt.

Mastermixansatz zur cDNA Synthese	
5x First Strand Buffer	4 µl
Oligo-dTs	0,5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
0,1 M DTT	2 µl

Tabelle 2: Mastermixansatz zur cDNA Synthese

Zu beiden Ansätzen (+RT und -RT) wurde je die Hälfte des Proben-Ansatzes (je 5,5 µl) hinzugegeben. Anschließend fand bei 42 °C die Reverse Transkription (50 min) statt. Durch die Erhitzung der Ansätze auf 72 °C für 15 min wurde die Reaktion beendet.

2.4.3 Qualitative Polymerasekettenreaktion

Material:

- 10× Buffer, Qiagen, Hilden, D
- dNTP Set, Qiagen, Hilden, D
- HotStar Taq Polymerase, Qiagen, Hilden, D
- Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, D
- $MgCl_2$ (25 mM), Qiagen, Hilden, D
- Primer siehe Tabelle 4, Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA

Mastermix für die qualitative Polymerasekettenreaktion (PCR)	**bei 1,5 mM $MgCl_2$**	**bei 2,5 mM $MgCl_2$**
10x Buffer	2 µl	2 µl
dNTPs	0,4 µl	0,4 µl
Taq Polymerase	0,125 µl	0,125 µl
H_2O Ampuwa	14,5 µl	13,7 µl
$MgCl_2$	0 µl	0,8 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz	17,025 µl	17,025 µl

Tabelle 3: Mastermix für die qualitative PCR bei 1,5 mM und 2,5 mM $MgCl_2$

Gen	Sequenz (5´ nach 3) S = Sense, AS = Antisense	Gen Bank	Länge (bp)	$MgCl_2$ (mM)
β-Aktin	S: gtgggaatgggtcagaagg Start: 212; Exon 3 AS: gaggcatacagggacagca Start: 513 Exon 4	NM_007393.3	302	1,5
RET	S: cctgctgtccatcttctgtgt, Start: 1953, Exon: 11 AS: ttccaaactcgccttctcc, Start: 2212, Exon: 12	NM_009050.1	260	2,5
TRPV1	S: gctgctaacggggacttctt, Start: 691, Exon: 4 AS: cttcagtgtggggtggagtt, Start: 975, Exon: 5	NM_001001445.1	285	2,5
GFRα1	S: cacgactaccactgccttcc, Start: 1213, Exon: 7 AS: cagcgagaccatcctttcc, Start: 1397, Exon: 9	NM_010279.2	185	2,5
GFRα2	S: tgacggagggtgaggagtt, Start: 1072, Exon: 2/3 AS: gcagatggagatgtaggaggag, Start: 1280, Exon: 4	NM_008115.2	209	2,5
GFRα3	S: ctgctactggtgctgtcgtt, Start: 137, Exon: 1 AS: ctgagttgttctgctgcctct, Start: 366, Exon: 2	NM_010280.2	230	2,5
GFRα4	S: aacccctgcttggatggt, Start: 670, Exon: 3/4 AS: gtcgtccacggttcatgtt, Start: 901, Exon: 5	NM_020014.1	232	2,5
GDNF	S: ctgtctgcctggtgttgct, Start: 153, Exon: 2 AS: ctgccgcttgtttatctgg, Start: 383, Exon: 3	NM_010275.1	231	1,5
Neurturin	S: tgtctggatgtgccaggag Start: 405 Exon 2 AS: gcagcccagggagaaagt Start: 581 Exon 3	NM_008738.2	177	1,5
Artemin	S: ctgggacttgcagagcctac Start 1078 Exon 3 AS: gacattgggtccagggaag Start 1205 Exon 4	NM_009711.4	128	1,5
Persephin	S: gccccatcagggtaacaac, Start: 144, Exon: 1 AS: caaggaaggtcacatcagca, Start: 406, Exon: 2	NM_008954.1	263	1,5

Tabelle 4: Primer, alle Primer sind intronspannend.

Für den PCR-Ansatz wurde ein Mastermix (siehe Tabelle 3) vorbereitet. Die finale $MgCl_2$-Konzentration im Mastermix unterschied sich je nach Primer (siehe Tabelle 4).
Vom jeweiligen Primermix wurden 2 µl zusammen mit 17,025 µl Mastermix und 1 µl der cDNA/–RT-Kontrolle/Wasserkontrolle in ein Reaktionsgefäß gegeben (Endkonzentration der Primer: 250 nM). Im Cycler wurden die Hot-Start Taq-Polymerase aktiviert (15 min, 95 °C). Es folgte die Denaturierung der DNA-Stränge (30 s, 95 °C). Die Annealing Temperatur betrug 60 °C bzw. 61,5 °C bei Artemin (30 s). Die Elongation erfolgte bei 72 °C. In der Regel wurden 40 Zyklus- Wiederholungen pro PCR durchgeführt (β-Aktin: 33 Zyklen; Artemin: 35 Zyklen). Zur finalen Elongation wurden die Ansätze 10 min lang auf 72 °C gehalten.

2.4.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Material:

- I-Cycler MyiQ2, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
- iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
- PCR-Reaktionsgefäße 0,6 ml, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
- Primer (siehe Tabelle 4; Life technologies (Invitrogen), Carlsbad, USA)

Mastermix für die quantitative PCR	
SYBR Green Supermix	12,5 µl
Primermix	0,5 µl
H_2O	11 µl
cDNA	1 µl
Gesamtvolumen pro Ansatz	25 µl

Tabelle 5: Mastermix für die quantitative PCR

Die Amplifizierung im I-Cycler erfolgte nach folgendem Schema: Aktivierung der Polymerase für 5 min bei 95 °C, Denaturierung der Matrizen für 20 s bei 95 °C, Annealing für 20 s bei 60 °C bzw. 61,5 °C und Elongation für 20 s bei 72 °C.
Proben wurden im doppelten Ansatz, -RT und Wasserkontrollen nur einmal angesetzt. Die ermittelten Ct-Werte (*cycle threshold*-Werte) der Proben wurden anschließend gemittelt. Zur Spezifitätsbestimmung der entstandenen DNA-Fragmente erfolgt eine Schmelzkurvenanalyse nach Beendigung der PCR. Es folgte eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte (siehe 2.4.6).

2.4.5 Auswertung der quantitativen PCR

Der „Ct-Wert" (*cycle threshold*: Stelle der Fluoreszenzkurve, an dem sie erstmalig exponentiell höher als das Hintergrundsignal wird) der Proben wurde bestimmt. Die mRNA-Expressionen wurden relativ nach der Formel „$2^{-(\Delta CT)}$/Mittelwert der $2^{-(\Delta CT)}$-Werte der PBS-Gruppe" quantifiziert. Dazu wurden die gemessenen Ct-Werte der Targets auf den Ct-Wert des Housekeeping-Gens „β-Aktin" bezogen und deren Differenz berechnet (ΔCt). Die $2^{-(\Delta CT)}$-Werte der OVA-Gruppe wurden dann durch den Mittelwert der der $2^{-(\Delta CT)}$–Werte aller Tiere der PBS-Gruppe geteilt.

2.4.6 Gelelektrophorese

Material:

- Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
- 0,5 M EDTA pH 8,0, Life Technologies (Ambion), Carlsbad, USA
- Eisessig, Merck, Darmstadt, D
- Ethidiumbromid, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Gelelektrophoresekammer u. Zubehör, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Orange-G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Power Supply PS500XTDC, Hoefer, Holliston, USA
- UV Transilluminator, Biometra, Göttingen, D

50x TAE Puffer	
TRIS	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H_2O	ad 1 l

Tabelle 6: 50x TAE Puffer

Ein 2%iges Agarosegel (2 g Agarose, 100 ml 1x TAE) wurde aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Proben (20 µl) wurden mit 5 µl Probenauftragspuffer (bestehend aus einer Spatelspitze Orange-G, gelöst in 25 ml Glycerol und 25 ml 1x TAE) vermischt und auf das Gel aufgetragen (je 5 µl). Ein Strom von ca. 270 mA wurde an eine mit 1x TAE Puffer beladene Kammer, in der sich das Gel befand, angelegt. Nach ausreichender Laufzeit des Gels wurde unter einer 8 bit/12 bit UV-Kamera ein Bild aufgenommen.

2.5 Immunhistologie

Material:

- Aceton, Merck, Darmstadt, D
- AxioCam MRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Axioplan 2 Imaging Fluoreszensmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- AxioVision rel 4.8 Software, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Formaldehyd, Merck, Darmstadt, D
- Isopropanol, Merck, Darmstadt, D
- Kryostat Leica CM 1900, Leica, Wetzlar, D
- Methylbutan, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Pap Pen, abcam, Cambridge, England
- Parafilm, Bemis, Neenah, USA
- Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, D
- Pikrinsäure, Merck, Darmstadt, D
- Pferdeserum, PAA Laboratoriers GmbH, Pasching, Österreich
- Primärantikörper (siehe Tabelle 7)
- Proteine/Peptide (siehe Tabelle 10)
- Saccharose, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8)
- SuperFrost Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Tween 20, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Murines Antigen	Wirtsspezies	Klon Nr.	Firma	Produkt Nr.	Konz. (µg/ml)
GDNF	Kaninchen, polyklonal		Alomone Labs	ANT014	4
Neurturin	Ziege, polyklonal		Santa Cruz	NTNR19 sc8173	4
Artemin	Ziege, polyklonal		R&D Systems	AF1085,	5
Persephin	Ratte, monoclonal, IgG2A	240839	R&D Systems	MAB2479	20

Tabelle 7: Primärantikörper für die Immunhistochemie; Ak = Antikörper.

Antigen	Wirtsspezies	Konjugat	Firma	Produkt Nr.	Konz. (µg/ml)
Kaninchen-Ig	Esel	Cy3	Chemicon	AP182P	0,5
Ziege-Ig	Esel	Cy3	Chemicon	AP180C	1,25
Ratte-Ig	Huhn	Texas Red	Molecular Probes	A21471	5

Tabelle 8: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie; Ig = Immunglobulin.

PBS		
Lösung A	200 mM NaH_2PO_4x $2H_2O$; Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	28,75 ml
Lösung B	200 mM Na_2HPO_4x $2H_2O$; Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	96,20 ml
NaCl		22,4 g
H_2O		ad 5 l

Tabelle 9: PBS; phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,4.

Für den PBS+S Puffer wird die Menge an NaCl auf 44,8 g verdoppelt.

Antigene zur Präabsorption	Firma	Produkt Nr.	Konz. (µg/ml)
GDNF Peptid (C)DDNLVYHILRKHSAKR	Alomone Labs	ANT014P	4 (gezeigt) und 12
Neurturin-Peptid *	Santa Cruz	NTN R19 sc8173	4
Rekombinantes Artemin	R&D Systems	1085-AR-025	5 (gezeigt) und 15
Rekombinantes Persephin	Peprotech	450-35	20

Tabelle 10: Antigene zur Präabsorption,* = korrespondierendes Peptid zum Antikörper gegen Neurturin in Tabelle 7, wird vom Hersteller im Datenblatt nicht weiter spezifiziert.

Gepuffertes Glycerol		
Lösung A	1,5 M Na_2CO_3	250 ml
Lösung B	1,5 M $NaHCO_3$	250 ml
Lösung B mit Lösung A auf pH 8,6 einstellen		
Lösung C	Glycerol	500 ml

Tabelle 11: Gepuffertes Glycerol

In Vorversuchen wurde die Bindung der Antikörper an Schnitten mit verschiedenen Fixierungen getestet (Aceton, Isopropanol, 4% Paraformaldehyd, Zamboni). Zur Immersionsfixierung in Zamboni und Paraformaldehyd (PFA) wurden die Gewebe nach der Tiertötung durch Ausbluten, wie in 2.3.2 beschrieben, präpariert und über Nacht in 4% PFA (4% PFA in 0,1 M Phosphatpuffer [PP], pH 7,4) oder Zamboni-Fixationslösung (2% Formaldehyd in 0,1 M PP mit 15% gesättigter Pikrinsäure, pH 7,4) fixiert. Anschließend wurden die Gewebe 4x je 1 h lang in 0,1 M PP gewaschen und über Nacht in 18 % Saccharose in 0,1 M PP inkubiert. Die Gewebe wurden in TissueTek eingebettet und in Methylbutan (in flüssigem Stickstoff gekühlt) schockgefroren. Bei ca.

-20 °C wurden ca. 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Super Frost Objektträger aufgetragen.

Die besten Ergebnisse ergaben sich bei allen vier Antikörpern bei der Fixierung in Aceton, so dass in den folgenden Versuchen nur noch diese Fixierung genutzt wurde. Zur Fixierung in Aceton und Isopropanol wurden native, präparierte Gewebe wie oben beschrieben schockgefroren und Gewebeschnitte auf Super Frost Objektträger aufgetragen. Die Gewebeschnitte wurden 10 min lang in -20 °C kaltem Aceton bzw. in 4°C kaltem Isopropanol fixiert und anschließend getrocknet (30 min bei Fixierung in Aceton, 1 h bei Fixierung in Isopropanol). Im Anschluss wurden die mit PAP-Pen umrandeten Schnitte für 1 h mit Histoblocklösung (10% Pferdeserum, 0,5% Tween, 0,1% Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* [BSA]) in PBS, pH 7,4) inkubiert. Nach dem Absaugen der Blocklösung wurden ca. 100 µl Antikörperlösung pro Objektträger aufgebracht (siehe Tabelle 7) und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Antikörperlösungen abgesaugt und die Objektträger zweimal je 10 min lang in PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit je 100 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 8) für 1 h inkubiert. Es folgten je zwei Waschschritte mit PBS und die Fixierung in 4% PFA bevor die Präparate zwei weitere Male in PBS gewaschen wurden. Zuletzt wurden die Pufferreste sorgfältig abgesaugt, die Proben mit gepuffertem Glycerol beschichtet und mit einem Deckgläschen verschlossen. Die Proben wurden bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert. Bei allen Versuchen wurde für jeden Sekundärantikörper eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, bei der statt einem Primärantikörper nur PBS aufgetragen wurde. Damit sollte überprüft werden, ob der Sekundärantikörper unspezifisch bindet. Zur Überprüfung, ob der Primärantikörper an sein Zielprotein binden kann, wurden Präabsorptionskontrollen durchgeführt. Die verdünnten Antikörper wurden dazu für 2 h bei Raumtemperatur zusammen mit Peptiden/Proteinen der zu detektierenden Zielproteine (Tabelle 10) inkubiert. Bei Bindung der gelösten Zielproteine/Peptide konnten die Antikörper nicht mehr an die Zielproteine in den Schnitten binden. In diesem Fall zeigte sich bei gleicher Belichtungszeit ein schwächeres Signal.

2.6 Westernblot

Um die Synthese der Zielproteine nachzuweisen und zu untersuchen, ob sich diese zwischen Tieren der PBS- und OVA-Gruppe unterscheidet, wurden Westernblots durchgeführt und die Signalintensitäten der Banden quantifiziert und verglichen. Aufgrund der Ergebnisse der zuvor angefertigten quantitativen PCR wurden nur GDNF und Artemin im Westernblot untersucht.

2.6.1 Harnstoffextraktherstellung

Material:

- 1,4-DTT, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Harnstoff, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Proteinase Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, Calbiochem (Merck Millipore), Billerica, USA
- SDS, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Zentrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, D

Harnstoffpuffer:	
8 M Harnstoff	1000 µl
Glycerol	100 µl
20% SDS	50 µl
1 M DTT	5 µl
1 M Tris pH 6,8	10 µl
100 mM PMSF	5 µl
Protease Inhibitor	5 µl

Tabelle 12: Harnstoffpuffer

Zur Herstellung eines Proteinextraktes wurden die entsprechenden Organe grob mit einem Skalpell zerkleinert und das Gewicht bestimmt. Die Gewebe wurden mit der zehnfachen Menge eines Harnstoffpuffers (Tabelle 12) inkubiert. Eine Metallkugel wurde in jedes Reaktionsgefäß gegeben und die Proben wurden für 10 min bei 30 Hz in der Kugelmühle zerkleinert. Anschließend wurden die Proben 3 min lang bei 5000 rpm zentrifugiert.

2.6.2 Proteinbestimmung mit Pierce 660 nm Protein Assay am Nanodrop

Material:

- Pierce 660 nm Protein Assay Reagenz, Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, USA
- Pre-Diluted Protein Assay Standards BSA Set, Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, USA

Zur spektralphotometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration der Gewebelysate wurde der Pierce 660 nm Protein Assay genutzt. Eine Standardkurve verschiedener vorgefertigter Proteinkonzentrationen (0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) wurde angefertigt. Die Gewebeextrakte wurden zur Messung 1:10 und 1:20 mit 0,9% NaCl verdünnt. Von jeder Probe und jeder vorgefertigten Proteinlösung des Standardsets wurden je 4 µl mit 60 µl des Protein Assay Reagenz (50 mg Ionic Detergent Compatibility Reagent gelöst

in 1 ml Reagenz) vermischt. Die verdünnten Proben wurden jeweils mindestens zweimal gemessen und aus den Mittelwerten unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Proteingehalt bestimmt.

2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Material:

- Ammoniumpersulfat (APS), Merck, Darmstadt, D
- Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D
- Bromphenolblau-Na-Salz, SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
- Centrifuge Espresso, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- 1,4-DTT, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Dual Gel Caster SE245, Hoefer, San Francisco, USA
- Elektrophorese System SE250, Hoefer, San Francisco, USA
- Glycin, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Kühlsystem Rm6B Lauda, Lauda Dr. R. Wobser GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen, D
- Page Ruler prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, USA
- Power Supply PS500XTDC, Hoefer, San Francisco, USA
- Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- 1 N Salzsäure, Merck, Darmstadt, D
- SDS (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide*), SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
- Tetramethylethylenediamin (TEMED), Carl Roth GmbH u. Co. KG, Karlsruhe, D

5x Probenpuffer	
Tris	1,96 g
SDS	2,5 g
Bromphenolblau	12,5 mg
Mit H_2O	ad 20 ml, dann auf pH 6,8 einstellen
Glycerol	25 ml
Mit H_2O .	ad 50 ml

Tabelle 13: 5x Probenpuffer

	Sammelgel (30 ml = 4 Gele)	**Trenngel 15%**
30% Acrylamid/0,8 Bisacrylamid	1,0 ml	15,0 ml
2 M Tris/HCl pH 6,8	50 µl (pH 6,8)	5,6 ml (pH 8,8)
20% SDS	1,2 ml	150 µl
H_2O	7,7 ml	9,25 ml
TEMED	15 µl	15 µl
10% Ammoniumpersulfat	120 µl	160 µl

Tabelle 14: Sammelgel und Trenngel 15%

Aufgrund der zu erwartenden Produktgrößen wurde ein 15%iges Trenngel in der Kammer gegossen. Nach dem Aushärten des Trenngels (unter einer Schicht aus 0,5% SDS) wurde ein Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit Probentaschen versehen.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer geklemmt, diese wurde mit Elektrodenpuffer (250 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% SDS in H_2O) gefüllt. Die Kammer wurde geschlossen und die Spannungsquelle eingeschaltet. Für den Durchlauf der Proben im Sammelgel wurde eine Spannung von 100 V, beim Trenngel von 200 V eingestellt.

2.6.4 Transfer

Material:

- Immobilion-P Transfer Membran, Carl Roth und Co GmbH, Karlsruhe, D
- Rotilabo-Blotting Papiere 0,35 mm, Carl Roth und Co GmbH, Karlsruhe, D
- Transferkammer, SEDEC M, Peqlab Erlangen, D
- Tween 20, Sigma Aldrich, St. Louis, USA

	Konz. Anodenpuffer	**Anodenpuffer**	**Kathodenpuffer**
6-Aminohexansäure			40 mM
Tris	300 mM, pH 10,4;	30 mM, pH 10,4	25 mM, pH 9,4
20% Methanol	50 ml	50 ml	50 ml
H_2O	ad 250 ml	ad 250 ml	ad 250 ml

Tabelle 15: Puffer für Westernblot

Zum Transfer wurden in der Transferkammer Blotting Papiere (8,5 cm x 5,5 cm), die in verschiedenen Puffern getränkt wurden, gestapelt. Zwischen die Papiere wurde die PVDF-Membran und das Elektrophoresegel gelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen werden konnten. Dazu musste die Membran erst 15 s lang in Methanol aktiviert werden und anschließend in H_2O 2 min lang inkubiert werden. Die PVDF-Membran wurde in Anodenpuffer, das SDS Gel in Kathodenpuffer äquilibriert. Der Deckel der Transferkammer wurde fest verschlossen und für 90 min ein Strom von 180 mA angelegt.

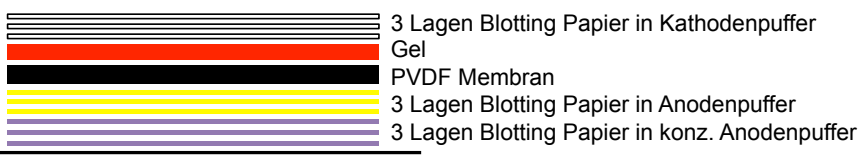

Abbildung 6**: Aufbau des Blotting-Sandwiches**

2.6.5 Immundetektion

Material:

- Antikörper (siehe Tabelle 16 und Tabelle 18)
- Milchpulver, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, D
- Schüttelplatte, Swip Akku, Edmund Bühler, Hechingen, D

Murines Antigen	**Wirtsspezies**	**Klon Nr.**	**Firma**	**Produkt Nr.**	**Konz. (µg/ml)**
GDNF	Kaninchen, polyklonal		Alomone Labs	ANT-014	1,6
Artemin	Ratte, monoklonal, IgG2a	185234	R&D Systems	MAB10851	1
Persephin	Ratte, monoklonal, IgG2a	240839	R&D Systems	MAB2479	20

Tabelle 16: Primärantikörper

Antigene zur Präabsorption	Firma	Produkt Nr.	Konz. (µg/ml)
GDNF-Peptid (C)DDNLVYHILRKHSAKR	Alomone Labs	ANT014P	1,6 (gezeigt) und 4,8
Rekombinantes Maus-GDNF	Peprotech	450 44	
Rekombinantes Artemin	R&D Systems	1085-AR-025	1 und 2 (gezeigt)

Tabelle 17: Westernblot (WB) Antigene zur Präabsorption

Antigen	**Wirtsspezies**	**Konjugat**	**Firma**	**Produkt Nr.**	**Konz. (µg/ml)**
Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Pierce, Thermo scientific	31460	0,08
Ratte-IgG	Ziege	HRP	Pierce, Thermo scientific	31470	0,08

Tabelle 18: Sekundärantikörper; HRP = horseradish peroxidase.

Nach dem Transfer wurde die Membran in einer feuchten Kammer für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit 10%igem Milchpulver in TTBS-Puffer (10 mM Tris/150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) geblockt. Der Primärantikörper wurde in 5% Milchpulver in TTBS/0,1% Natrium-Azid gelöst (2 ml pro Membran). Die Präabsorptionskontrollen mit Blocking-Peptiden oder rekombinanten Proteinen wurden mindestens 2 h vor Verwendung angesetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die 10% Milchpulverlösung wurde nach 1 h abgesaugt und die verdünnten Primärantikörper wurden auf die Membranen pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Membran 4x für 10 min mit TTBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 2,5% Milchpulver in TTBS verdünnt und die Membran 1 h lang damit inkubiert. Anschließend wurde sie 6x für je 5 min mit TTBS gewaschen.

2.6.6 Chemilumineszenzdetektion

Material:

- Fusion FX7, Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
- Ponceau S Lösung 0,1% (w/v) in 5% Essigsäure, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Röntgenfilm, Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK
- Röntgenfilmentwickler und Röntgenfilmfixierer, AGFA, Mortsel, B
- Super Signal West Pico und Dura Chemiluminescent Substrate (ECL), Thermo scientific, Waltham, USA

Im Fusion FX7 wurden alle Membranen fotografiert um die Markerhöhe zu dokumentieren. Dann wurden sie für 5 min im Dunkeln mit ECL-Substrat inkubiert. In Abhängigkeit von der Signalstärke wurde die Belichtungszeit eingestellt. Nach der Belichtung wurden Fluoreszenzbild und Markerfoto zusammengesetzt. Alternativ wurde die Membran nach der Inkubation mit ECL-Substrat in einer Kasette zwischen zwei Folien geklemmt. In der Kasette erfolgte die Exposition eines zugeschnittenen Röntgenfilms, der anschließend in der Dunkelkammer entwickelt und fixiert wurde. Auf die getrockneten Röntgenfilme wurde der Marker übertragen. Abschließend wurden alle Proteine auf den Membranen mit Ponceau-Lösung angefärbt

2.6.7 Densitometrie und Auswertung der Bandenintensitäten der Westernblots

Material:

- Excel, Microsoft Office 2011, Microsoft, Redmond, USA
- ImageJ, RSB (Research Services Branch), Bethesda, USA

Zur Quantifizierung der Bandenintensitäten der Westernblots wurden die Antikörpersignale der Zielproteine und die Signale der gesamten Proteinmenge der Proben mit einem Bildprogramm ermittelt. Der Versuch wurde von 3 unabhängigen Beobachtern geblindet durchgeführt. Das Signal der gesamten Proteine wurde anhand der Ponceau-Färbung der Membran bemessen. Die Beobachter mussten gleichgroße Kästchen um die jeweiligen Probenspuren legen. Die Signalstärke wurde anhand der Färbungsintensität berechnet. Das Signal des jeweiligen Zielproteins wurde auf gleiche Weise auf den immunodetektierten Membranen markiert und ermittelt. Anschließend wurde für jede Probe der Quotient aus Antikörpersignal und Gesamtproteinsignal gebildet.

2.7 Laserassistierte Mikrodissektion

2.7.1 Die Mikrodissektion

Material:

- CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP, Upland, USA
- Membrane Slide 1.0 PEN, Carl Zeiss, Jena, D
- Micro Beam System PALM Microlaser Technologies, Carl Zeiss Jena, D
- Micro Tube 500 (D) Carl Zeiss, Jena, D
- Mineralöl für die Molekularbiologie, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, D

Um eine PCR von laserassistiert gewonnenen Gewebefragmenten durchzuführen, wurden Kryostatschnitte auf spezielle „Membranslides“ aufgezogen, die zuvor 30 min lang mit UV Licht (254 nm Wellenlänge) aktiviert wurden. Nach der Trocknung (15 min) wurde eine Färbung mit Hämatoxilin durchgeführt (2 min Inkubation). Es folgten 3 Spülungen: 1. H_2O, 2. 70% Ethanol, 3. 80% Ethanol. Die gefärbten Schnitte wurden in 100% Ethanol auf Eis gelagert. Pro Tier wurden je 3 Objektträger mit Lungen- und Trachealschnitten bestückt. Zum Ausschneiden der Gewebe von Interesse wurden die Objektträger in den Halter gelegt. Der Deckel eines speziellen Reaktionsgefäßes wurde mit 1 µl Mineralöl befeuchtet und in die Halterung eingespannt. Die jeweiligen Strukturen (Gesamtbronchus, Alveole, Trachealmuskel) wurden markiert. Mittels Laser wurden sie ausgeschnitten und jeweils in den Deckel des Reaktionsgefäßes katapultiert, so dass sie am Mineralöl anhafteten.

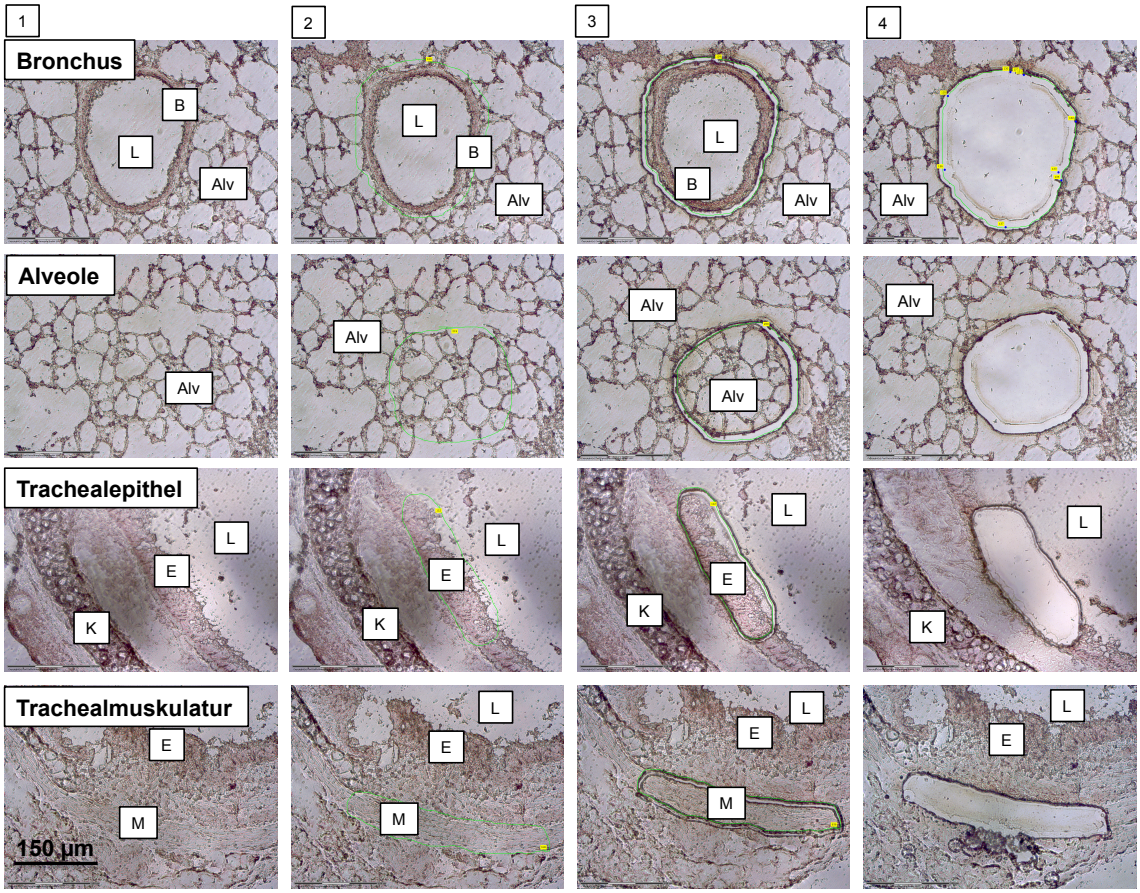

Abbildung 7: **Lichtmikroskopische Bilder der Proben während der Lasermikrodissektion.** Dargestellt ist eine Hämatoxylin-Färbung von Lungen-/Trachealschnitten. Die Mikrodissektion ist von links nach rechts im Ablauf dargestellt: 1.) Fokussieren des Präparates. 2.) Markierung des zu untersuchenden Gewebes. 3.) Schnitt mittels Laser. 4.) Fehlen des Gewebefragments nach Katapultierung ins Reaktionsgefäß. E = Epithel; L = Lumen der Atemwege; Alv = Alveole; B = Bronchus; K = Knorpel; M = glatte Muskulatur.



Abbildung 8: **Lasermikroskop**.

2.7.2 RNA-Isolation mit dem Micro Kit

Material:

- RNeasy plus Micro Kit, Qiagen, Hilden, D

Die Reaktionsgefäße wurden nach Beendigung der Mikrodissektion mit 350 µl RLT-Puffer gefüllt und ca. 1 min lang kräftig mit dem Vortex gemischt, so dass alle Fragmente im Puffer homogenisiert wurden. Das Lysat wurde auf eine gDNA removal column gegeben und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit 350 µl 70% Ethanol vermischt und auf ein RNeasy MinElute spin column gegeben und zentrifugiert (30 s, 10000 rpm). Danach wurde die Säule mehrfach gewaschen, zunächst mit 700 µl RW1-Puffer, danach mit 500 µl RPE-Puffer (je 30 s, 10000 rpm). Anschließend wurde sie mit 500 µl 80% Ethanol beladen und zentrifugiert (2 min, 10000 rpm). Zum Trocknen wurden die Probengefäße 5 min lang geöffnet und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Eluieren wurden 14 µl H_2O auf die Membran der Säule pipettiert und für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert.

2.7.3 cDNA-Synthese von Proben der laserassistierten Mikrodissektion

Material:

- RNA PCR Core Kit (Produkt Nr. N808-0143), Life technologies (Applied Biosystems), Carlsbad, USA

Mastermix für die RT	
10x PCR Puffer	2 µl
25 mM $MgCl_2$	4 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Random Hexamer Primers	1 µl
RNAse Inhibitor	0,5 µl
MULV Reverse Transkriptase	1 µl
H_2O	2,5 µl

Tabelle 19: Mastermix für die RT

Protokoll der RT		
RNA Denaturation	70 °C	10 min
Abkühlen	4 °C	5 min
Hinzugeben des Master Mixes		
Inkubation	20 °C	10 min
Reverse Transkription	43 °C	75 min
Enzyminaktivierung	99 °C	5 min
	4 °C	∞

Tabelle 20: Protokoll der RT

Aus den Bestandteilen des Kits wurde ein Mastermix (Tabelle 19) angesetzt. Da die zu erwartende RNA-Menge sehr gering war, wurde auf eine photometrische Messung verzichtet und die gesamte Menge der gewonnenen RNA umgeschrieben. Zum Mastermix (pro Ansatz 12 µl) wurden 13 µl cDNA gegeben. Die Umschreibung in cDNA erfolgt im Thermocycler mit den in Tabelle 20 dargestellten Schritten. Die PCR und anschließende Gelelektrophorese erfolgten wie in 2.4.3.

2.8 Calciummessungen

Um den Effekt der GFLs auf die Stimulation der Neurone mit Zimtaldehyd (ZA; TRPA1-Ligand) und Capsaicin (CPS; TRPV1-Ligand) zu untersuchen, wurden Calciummessungen an sensiblen Neuronen aus dem Ggl. jugulare/nodosum des N. vagus durchgeführt.

2.8.1 Beschichtung der Deckgläschen

Material:

- Deckgläschen, R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Laminin Mouse Protein (0,5 mg/ml), Life technologies GmbH, Darmstadt, D
- Poly-L-Lysin, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D
- Zellkulturinkubator Heraeus, Hanau, D
- Zellkulturplatte 12, 24 well, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Die Deckgläschen (12 mm und 18 mm Durchmesser) wurden mit 100% Ethanol gewaschen, 3 x mit H_2O gespült, und bei 200 °C gebacken. Im Anschluss wurden sie vollständig (ca. 200 µl pro Gläschen) mit einer Lösung aus 5 µg/ml Laminin und 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin in H_2O beschichtet und 24 h lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden sie 3x mit H_2O gewaschen und dann bei Raumtemperatur getrocknet.

2.8.2 Dissoziation und Stimulation der Zellen des Ggl. jugulare/nodosum

Material:

- Dispase II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,D
- Fetal bovine Serum (FBS), Life technologies GmbH, Darmstadt, D
- Hanks balanced salt solution (HBSS), Life technologies GmbH, Darmstadt, D
- Kollagenase, Sigma Aldrich GmbH, Darmstadt, D
- Leibovitz 15 Medium (L-15, phenolrot), Life technologies GmbH, Darmstadt, D
- Pasteurpipetten, Science Products GmbH, Hofheim, D
- Penicillin/Streptomycin, Life technologies GmbH, Darmstadt D

Die präparierten Ganglien (Ggl. jugulare/nodosum) wurden in 2 ml HBSS mit Dispase II (2 mg/ml) und Kollagenase (2 mg/ml) überführt und dann bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min, 45 min und 60 min wurden die Ganglien mit dünner werdenden Glaspipetten mechanisch dissoziiert. Im Anschluss wurde die Suspension 3x mit je 15 ml L-15 Medium (L-15/10% FBS [hitzeinaktiviert bei 56 °C]/2% Penicillin/Streptomycin) gewaschen und 3 min lang bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde

anschließend vom Überstand befreit und in 5 µl L-15 Medium pro Deckgläschen gelöst. Die beschichteten Deckgläschen wurden in einer 24-Well Mikrotiterplatte mit je 5 µl der Zellsuspension beladen und 2 h lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Mikrotiterplatten über 4 h und ein anderer Teil über 24 h bei 37 °C in der feuchten Kammer im Brutschrank in 500 µl der folgenden verschiedenen Nervenwachstumsfaktoren- bzw. Zytokinlösungen inkubiert.

Nervenwachstumsfaktoren/ Zytokine	Firma	Produkt Nr.	Konz. (ng/ml)
Rekombinantes Artemin	R&D Systems	1085-AR-025	50
Rekombinantes GDNF	Peprotech	450 44	50
Rekombinantes NGF	alomone	N-130	50
Rekombinantes TNFα	Sigma Aldrich	T7539	50

Tabelle 21: Nervenwachstumsfaktoren und Zytokine zur Inkubation

2.8.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Material:

- α,β-Methylene-ATP, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D
- Calcium Imaging System, Till Photonics GmbH, Gräfelfing, D
- Capsaicin, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, D
- Dimethylsulfoxide (DMSO), SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg D
- Fura-2-AM, Life technologies GmbH, Darmstadt, D
- Glukose, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D
- Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt, D
- Calciumchlorid ($CaCl_2$), Merck, Darmstadt, D
- Kamera, Imago, Till Photonics GmbH, Gräfelfing, D
- Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Merck, Darmstadt, D
- Mikroskop, BX50W Olympus, Melville, USA
- Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$) Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, D
- Natriumhydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 + 2H_2O$), Merck, Darmstadt
- Objektträgerheizung, Delta 3TC3, Bioptechs Inc., Butler, USA
- Peristaltikpumpe Minipuls 2, Gilson Inc., Wisconsin, USA
- Software, TILLvisION, Till Photonics GmbH, Gräfelfing, D
- Zimtaldehyd, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, D

Die Neurone wurden für ca. 30-40 min mit Fura-2-AM beladen (Endkonzentration: 4 ng/µl). Fura-2-AM fluoresziert bei Bindung von Ca^{2+} und bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich. Bei Anregung mit 340 nm Wellenlänge wird das Signal

stärker, je mehr Ca^{2+} gebunden ist, hingegen bei 380 nm Wellenlänge schwächer. Die Ratio der Signale bei 340 nm und 380 nm Anregungswellenlänge kann so als ein direktes Maß der intrazellulären Calciumkonzentration verwendet werden.

Die Deckgläschen mit den anheftenden Zellen wurden 3 min vor dem Experiment in einer Kammer mit 36 °C warmem Locke-Puffer (136 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1,2 mM NaH_2PO_4+H_2O, 14,3 mM $NaHCO_3$, 10 mM Glukose, 1,2 mM $MgCl_2$, 2,2 mM $CaCl_2$) äquilibriert. Die Zellen wurden nacheinander mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Stoffe stimuliert, währenddessen wurden die intrazellulären Calciumkonzentrationen gemessen indem die Zellen einzeln markiert und das Verhältnis der jeweiligen Lichtintensitäten (340/380) ermittelt wurde.

Jede Probe wurde zunächst mit 1,5% Ethanol in Locke-Puffer (als Negativkontrolle) stimuliert. Im Folgenden wurden die Neurone mit α,β-Methylene-ATP (10^{-5} M) stimuliert, um zwischen Zellen aus dem Ggl. jugulare und Zellen aus dem Ggl. nodosum zu unterscheiden. Anschließend wurden sie mit ansteigenden Konzentrationen von ZA (3 µM, 30 µM, 300 µM) und CPS (3 nM, 30 nM, 300 nM) stimuliert. Die KCl-Stimulation (75 mM) wurde als Positivkontrolle verwendet. Zwischen den Stimulationen wurden die Zellen je 3 min lang mit Locke-Puffer gespült (siehe Abbildung 9).

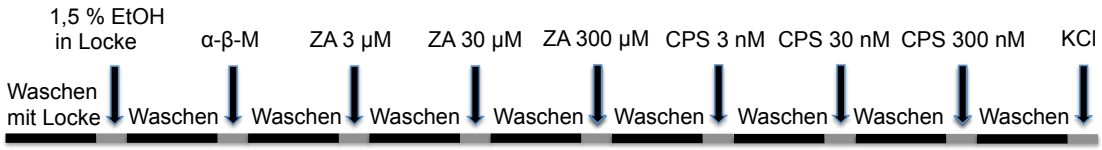

Abbildung 9: **Schema zur Stimulation.**
α-β-M = α,β-Methylene-ATP, ZA = Zimtaldehyd, CPS = Capsaicin.

Vor und nach jeder einzelnen Stimulation wurde in einem 60 s-Intervall alle 2 s ein Bildpaar aufgenommen. Das Intervall vor der Stimulation diente dabei als Baseline und wurde als Referenz zur Beurteilung der Reaktion auf den entsprechenden Stimulus genutzt. Als „positiv" wurden Reaktionen gewertet, sobald der maximale Anstieg mehr als 5% betrug und der Mittelwert der gemessenen Bildpaare größer als die Baseline plus die 2-fache Standardabweichung war. Alle Zellen, die auf KCl und/oder CPS reagierten, wurden in der Auswertung berücksichtigt. Zellen, die positive Reaktionen bei Stimulation mit der Negativkontolle zeigten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Alle Zellen, die auf α,β-Methylene-ATP keine Reaktion zeigten (als α,β-Methylene-ATP-negative/α,β-Methylene-ATP^- bezeichnet) und auf CPS reagierten (als CPS-positive/CPS^+ bezeichnet), wurden als C-Faserneurone des Ggl. jugulare definiert. Alle CPS^+ Neurone, die auf α,β-Methylene-ATP reagierten (als α,β-

Methylene-ATP-positive/α,β-Methylene-ATP$^+$ bezeichnet), wurden als C-Faserneurone des Ggl. nodosum definiert.

Der prozentuale Anteil der auf CPS reagierenden Neurone (C-Faserneurone) aus dem Ggl. jugulare bzw. Ggl. nodosum an der Gesamtpopulation der lebenden Neurone (KCl- und/oder CPS-positiv) wurde berechnet. Außerdem wurde die Änderung dieser Zahlen durch die 24-stündige Inkubation in Nervenwachstumsfaktoren bzw. Zytokinen (Tabelle 21) untersucht. Die gleichen Untersuchungen fanden mit ZA-positiven Zellen (ZA^+) statt (ZA^+/Gesamt, ZA^+/Zellen des Ggl. jugulare, ZA^+/Zellen des Ggl. nodosum, sowie die jeweiligen Differenzen in Abhängigkeit der Vorinkubation). Zusätzlich wurde errechnet, wie sich die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration auf einen Stimulus mit verschiedenen CPS-Konzentrationen ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) durch die Inkubation mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen verändert. Auch diese Untersuchungen wurden mit allen Zellen (Gesamtzellzahl) und den Subgruppen (Zellen aus Ggl. jugulare, und Ggl. nodosum) durchgeführt.

2.9 Statistik

Material:

- Excel, Microsoft Office 2011, Microsoft, Redmond, USA
- SPSS Statistics, International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, USA

Die statistischen Untersuchungen erfolgten (außer bei der Analyse der Calciummessungen) zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen Untersuchungsergebnissen der beiden Versuchsgruppen (PBS- vs. OVA-Gruppe). Das Signifikanzniveau betrug für alle Tests $p \leq 0{,}05$. Die Ergebnisse wurden in der Regel als Boxplots dargestellt. Sie zeigen Minimum-, Maximum- und Medianwerte, sowie die 25. und die 75. Perzentile.

Die Gesamtzellzahlen und Zahlen der Differentialzytologie der BAL sowie die der relativen Quantifizierung der Bandensignalstärke der Westernblots wurden mittels Mann–Whitney-U-Test analysiert. Die Ergebnisse der quantitativen PCRs beider Gruppen wurden ebenfalls mittels Mann-Whitney-U-Test miteinander verglichen. Im Anschluss an die Calciummessungen wurde per χ^2-Test statistisch untersucht, ob eine signifikante Änderung des prozentualen Anteils der Neurone, die auf eine bestimmte Stimulation reagierten vorlag. Ob eine signifikante Änderung des intrazellulären Calciumanstiegs durch die Inkubation mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen vorlag, wurde per Mann-Whitney-U-Test überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Auszählung und Differenzierung der Zellen in der bronchoalveolären Lavage

3.1.1 Gesamtzellzahlen und Differentialzytologie

Zum Nachweis der Atemwegsinflammation wurde die Gesamtzellzahl der Leukozyten in der BALF mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die OVA-Gruppe (n = 7) zeigte gegenüber der PBS-Gruppe (n = 7) einen signifikanten Anstieg der Leukozyten-Gesamtzellzahl von durchschnittlich 11,07 ± 1,70 x 10^4 Zellen/BALF um ca. das Zwölffache auf 136,86 ± 48,42 x 10^4 Zellen/BALF ($p \leq 0,05$).

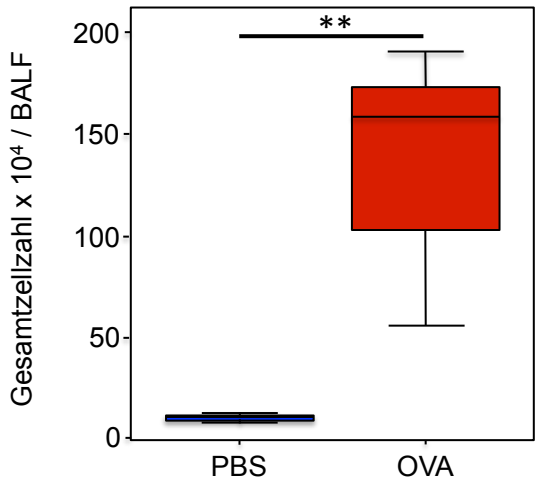

Abbildung 10: **Statistische Auswertung der Unterschiede der BALF-Gesamtzellzahl zwischen PBS- und OVA-Gruppe**.
Die Gesamtzellzahl der BALF von Mäusen nach OVA-Aerosolprovokation ist signifikant höher als die von Mäusen nach PBS-Aerosolprovokation**.** Die Gesamtzellzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und in (x 10^4) angegeben. Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. n = 7 Tiere/Gruppe; Mann-Whitney-U-Test ;** = $p \leq 0,01$.

Anschließend erfolgte die Differenzierung der Leukozyten in ihre Subpopulationen und die Berechnung der prozentualen Anteile der jeweiligen Subpopulationen an der Gesamtzellzahl. In der PBS-Gruppe bildeten die Makrophagen die größte Zellpopulation mit durchschnittlich 96,79 ± 4,21% Anteil an der Gesamtzellzahl, während in der OVA-Gruppe die eosinophilen Granulozyten mit 89,20 ± 4,73% die am häufigsten vertretene Subpopulation darstellten. Der Anteil der eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl der Leukozyten war in der OVA-Gruppe signifikant höher ($p \leq 0,05$) als in der PBS-Gruppe (Eosinophile: 2,36 ± 3,87% (PBS) vs. 89,20 ± 4,73% (OVA); Neutrophile: 0,24 ± 0,22% (PBS) vs. 2,20 ± 1,10% (OVA), Lymphozyten: 0,60 ± 0,19% (PBS) vs. 2,08 ± 0,40% (OVA), Mann-Whitney-U-Test). Der Anteil der Makrophagen an der Gesamtzellzahl der Leukozyten war in der PBS-Gruppe signifikant höher ($p \leq 0,05$) als in der OVA-Gruppe (96,79 ± 4,21% (PBS) vs. 6,22 ± 3,54% (OVA), Mann-Whitney-U-Test). Basierend auf diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass die Tiere der OVA-Gruppe eine allergische, eosinophile Atemwegsinflammation entwickelt hatten.

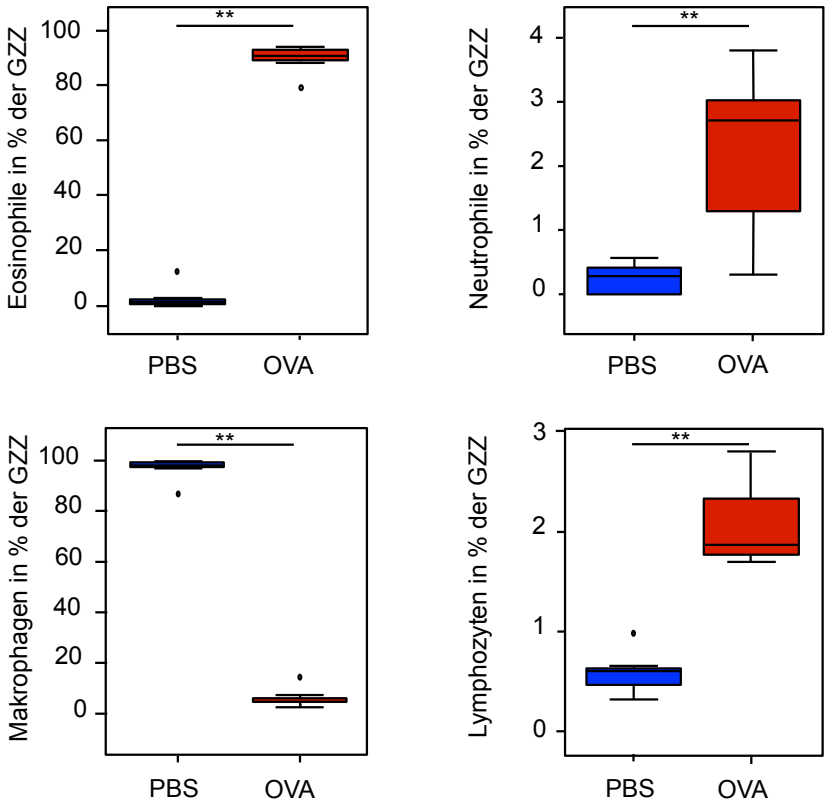

Abbildung 11: **Statistische Auswertung des Vergleiches der prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen zwischen PBS- und OVA-Gruppe.**
Der Anteil der Eosinophilen, Neutrophilen und Lymphozyten an der GZZ der BALF ist in der OVA-Gruppe höher, der von Makrophagen ist niedriger als in der PBS-Gruppe. Es wurden die verschiedenen Leukozyten im Durchlichtmikroskop ausgezählt und ihr prozentualer Anteil an der jeweiligen Gesamtzellzahl von ca. 600 ausgezählten Zellen berechnet. Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. Ausreißer werden mit einem kleinen Kreis dargestellt. n = 7 Tiere/Gruppe, GZZ = Gesamtzellzahl; Mann-Whitney-U-Test; ** = $p \leq 0{,}01$.

3.2 mRNA-Expression der GFLs in den Atemwegen und der GFL-Rezeptoren in Neuronen des Ggl. jugulare/nodosum

3.2.1 mRNA-Expression der GFL-Rezeptoren im Ggl. jugulare/nodosum

Um zu prüfen, ob die Rezeptoren der GFLs in den Neuronen des vagalen Ggl. jugulare/nodosum exprimiert werden, wurde in einer Probe aus mehreren sensiblen Ganglien ihre mRNA-Expression untersucht. Als *Housekeeping-Gen*-Kontrolle wurde β-Aktin in der Probe nachgewiesen, so dass sicher bestätigt werden konnte, dass die reverse Transkription erfolgreich stattgefunden hatte. Für jeden Ansatz wurde zusätzlich je eine Wasser- und eine -RT-Kontrollen analysiert. Diese Kontrollen waren alle negativ.
Eine mRNA-Expression der Rezeptoren RET, TRPV1, GFRα1, GFRα2, GFRα3 und GFRα4 konnte nachgewiesen werden. Ebenfalls nachweisbar war TRPV1, ein Kationenkanal aus der *transient receptor potential* Familie, der in nozizeptiven sensiblen Neuronen exprimiert wird (Abbildung 12).

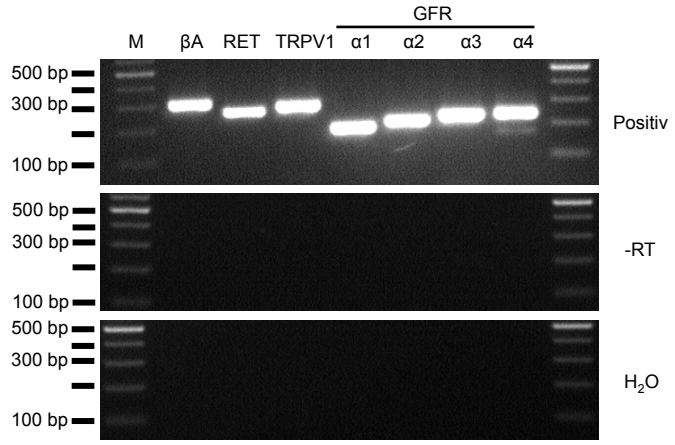

Abbildung 12: **Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid.**
Im Ggl. jugulare/nodosum wird mRNA von RET, TRPV1 und GFRα1-4 exprimiert.
βA = β-Aktin (302 bp), RET (260 bp), TRPV1 (285 bp), GFRα1 (185 bp), GFRα2 (209 bp), GFRα3 (230 bp), GFRα4 (232 bp), bp = Basenpaare. In Klammern ist die Produktgröße des jeweiligen Amplikons in bp angegeben. M = Marker; Positiv = cDNA aus Ggl. jugulare/nodosum; -RT = korrespondierende -RT-Kontrolle; H_2O = Wasserkontrolle; 40 Zyklen.

3.2.2 GFL-mRNA-Expression in Lunge und Trachea

Zunächst wurde die mRNA-Expression der GFLs in Trachea und Lunge mittels RT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle für GDNF, Neurturin und Persephin wurde cDNA von Gehirnen, für Artemin von Plazenten eingesetzt (Baloh et al., 1998b) (freundlicherweise überlassen von der Arbeitsgruppe von Prof. Bellusci des ECCPS Gießen). Für jeden Primer wurden zusätzlich Wasser- und für jede cDNA –RT-Kontrollen untersucht. Alle Negativkontrollen (Wasserkontrolle und –RT-Kontrolle von Lungen-, Tracheal-, Gehirn-, und Plazentaproben) waren negativ. In Abbildung 13 sind stellvertretend für alle 10 -RT-Kontrollen der Lungen- bzw. Trachealpräparationen je zwei repräsentative -RT-Kontrollen pro Zielgen sowie die jeweiligen Positivkontrollen und ihre –RT-Kontrolle dargestellt.

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Lungen GDNF-, Neurturin- und Artemin-mRNA exprimierten (n = 10). Persephin-mRNA wurde in 6 von 10 Lungen exprimiert (Abbildung 13). In den Tracheen konnten bei 10 von 10 Tieren mRNA für GDNF, Artemin und Persephin nachgewiesen werden. In 9 von 10 Präparaten war auch Neurturin-mRNA nachweisbar (Abbildung 13b).

Sowohl in den PCR-Produkten der Lungen- als auch der Tracheal-cDNA zeigten sich bei GDNF Doppelbanden (Abbildung 13). Eine Bande hatte wie erwartet eine Produktgröße von 231 bp und ein kürzeres Produkt war ca. 150 bp lang. Nach der Sequenzierung des kürzeren Produktes und dem Vergleich der Sequenzierungsdaten mit in der Literatur beschriebenen Sequenzen (Suter-Crazzolara & Unsicker, 1994) stellte sich heraus, dass es sich bei dem kürzeren Produkt um eine 78 Basenpaare kürzere Spleißvariante handelt.

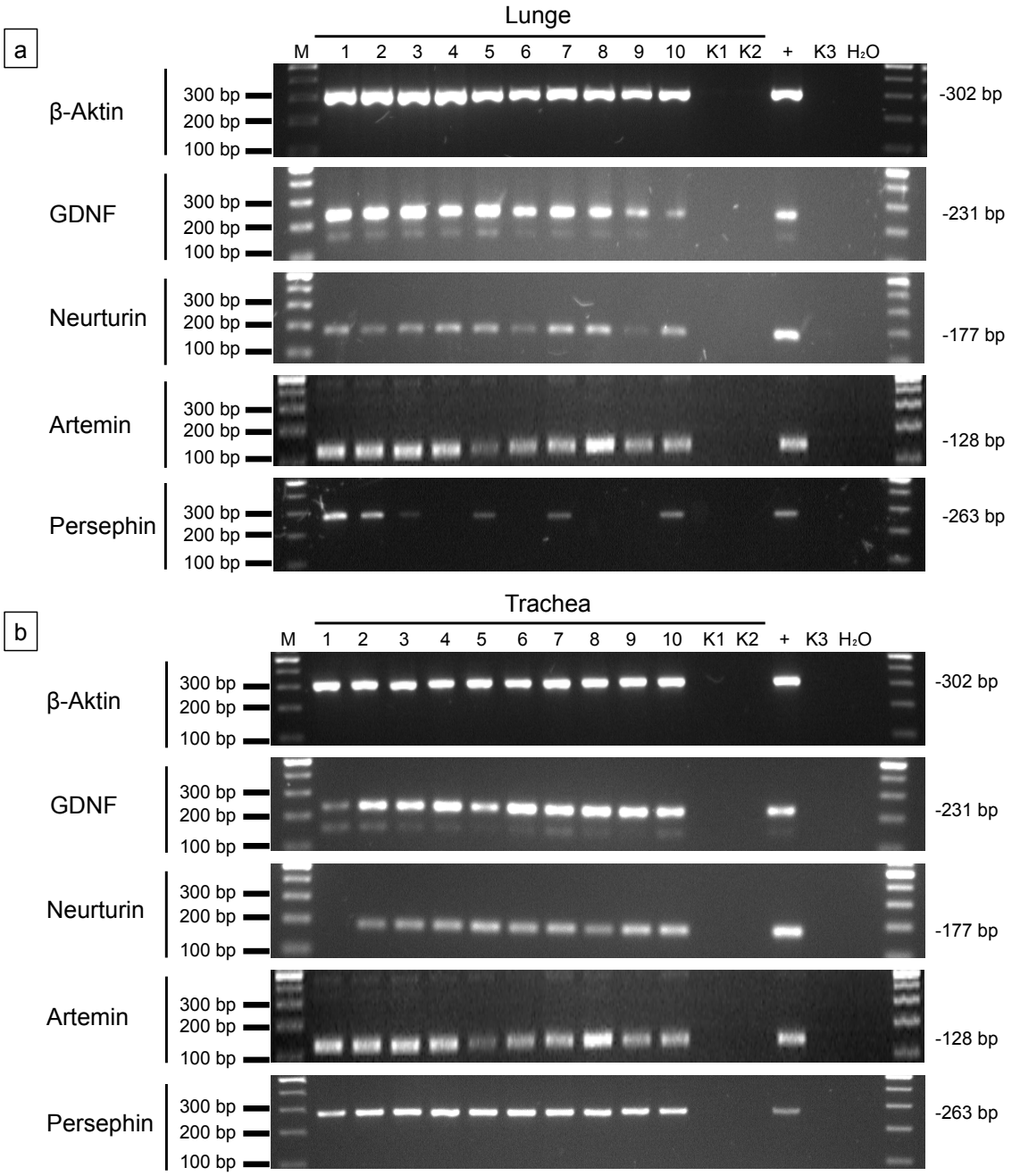

Abbildung 13: **Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid.**
GDNF-, Neurturin-, Artemin- und Persephin-mRNA wird in Lunge und Trachea exprimiert.
a) 1-10 = cDNA von Lungen von 10 verschiedenen Mäusen.
b) 1-10 = cDNA von Tracheen von 10 verschiedenen Mäusen.
M = Marker; K1/K2 = -RT Kontrolle von 2 repräsentativen Lungen- bzw. Trachealproben; + = Positivkontrolle (Gehirn-cDNA bei allen Zielproteinen außer Artemin, bei Artemin: Plazenta-cDNA), K3 = -RT Kontrolle der jeweiligen Positivkontrolle, bp = Basenpaare; H_2O = Wasserkontrolle; Am rechten Bildrand ist die Größe des jeweiligen Amplikons in bp dargestellt. n = 10; In der Regel wurden 40 Zyklen durchgeführt (β-Aktin: 33 Zyklen; Artemin; 35 Zyklen).

3.2.3 Lokalisation der mRNA-Expression

Nach dem Nachweis der GFL-mRNA in Lunge und Trachea sollte untersucht werden, welche Gewebe in den Atemwegen für die Synthese verantwortlich sind. Dazu wurden Bronchien, Alveolen, Trachealepithel und glatter Muskel der Trachea mit Hilfe der laserassistierten Mikrodissektion isoliert und die mRNA der Gewebefragmente mittels RT-PCR analysiert. Aufgrund der geringen Probenmengen wurden nicht alle Liganden untersucht. Der Fokus wurde bei diesen Untersuchungen auf GDNF als Ligand des GFRα1 Rezeptors und Artemin als Ligand des GFRα3 Rezeptors gelegt. GFRα1 wird hauptsächlich in C-Faserneuronen des Ggl. nodosum exprimiert, während GFRα3 spezifisch für Neurone aus dem Ggl. jugulare ist.

Es wurden zusätzlich Wasserkontrollen und Mineralölkontrollen durchgeführt, bei denen Wasser bzw. Mineralöl (das zum Anheften der Proben in den Reaktionsgefäßdeckel pipettiert wurde) an Stelle von cDNA zum Mastermix gegeben wurde. Die Kontrollen waren stets negativ (Abbildung 15).

GDNF-mRNA konnte in 4 von 6 Bronchial- und in allen untersuchten Alveolarpräparationen sowie in 3 von 5 Trachealepithel- und 2 von 5 Trachealmuskulaturproben nachgewiesen werden. Artemin-mRNA ließ sich in allen Bronchial- und allen Trachealmuskulaturpräparationen sowie in je 4 von 6 Alveolar- und von 5 Trachealepithelproben nachweisen (Abbildung 15 und Tabelle 22). Die Abbildung 15 zeigt repräsentative Bilder der Versuchsergebnisse von einem der insgesamt 5-6 Versuchstiere. Neben den amplifizierten cDNAs werden jeweils auch die Öl- und die Wasserkontrolle des Tieres gezeigt.

	β-Aktin	**GDNF**	**Artemin**
Bronchus	6/6	4/6	6/6
Alveole	6/6	6/6	4/6
Trachealepithel	5/5	3/5	4/5
Trachealmuskulatur	5/5	2/5	5/5

Tabelle 22: **Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse von Proben, die mit Hilfe der laserassistierten Mikrodissektion gewonnen wurden**.
x/y: x = Anzahl der Versuche, bei denen die entsprechende mRNA nachgewiesen wurde, y = Anzahl der insgesamt durchgeführten Versuche; n = 5-6 Versuche pro Gewebe und Zielgen.

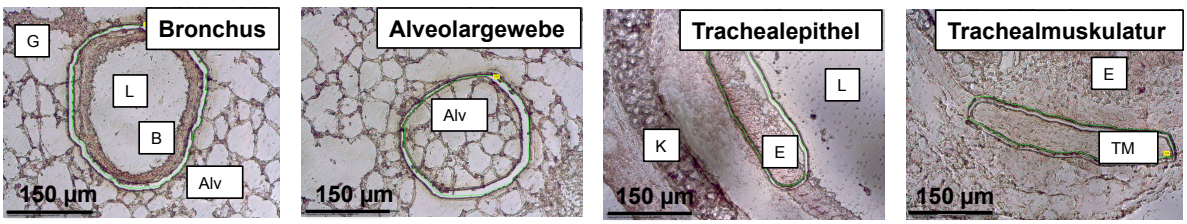

Abbildung 14: **Lichtmikroskopisches Bild der Proben während der laserassistierten Mikrodissektion.**
Dargestellt sind die 4 isolierten Gewebe in einer Hämatoxylin-Färbung. E = Atemwegsepithel; K = Knorpelspangen der Trachea; G = Blutgefäße; L = Lumen der Atemwege.

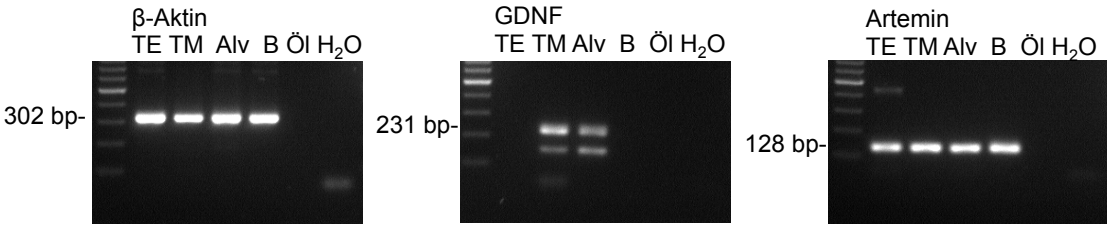

Abbildung 15: **Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte von Proben, die mittels laserassistierter Mikrodissektion gewonnen wurden, in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid.**
Es wird pro Ziel-mRNA je ein repräsentatives Bild von einem Versuchstier gezeigt. Die Endergebnisse aller Versuche sind
Tabelle 22 zu entnehmen. TE = Trachealepithel, TM = Trachealmuskulatur, Alv = Alveolargewebe, B = Bronchus, Öl = Mineralölkontrolle, H_2O = Wasserkontrolle, bp = Basenpaare, n = 5-6, 50 Zyklen.

3.2.4 Veränderung der GFL-mRNA-Expression im Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Um den Einfluss der Atemwegsentzündung auf die GFL-Synthese zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von Tieren der PBS-Gruppe (n = 13) und Tieren der OVA-Gruppe (n = 12) mittels quantitativer RT-PCR miteinander verglichen. Die GDNF- und Neurturin-mRNA Expression war in der OVA-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe jeweils signifikant erniedrigt ($p \leq 0,05$; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 16).

Die Expression der Artemin-mRNA zeigte in der OVA-Gruppe eine Tendenz zum Anstieg gegenüber der Expression in der PBS Gruppe ($p > 0,05$). Die Persephin Expression war in beiden Gruppen fast gleich stark ($p > 0,05$; Abbildung 16).

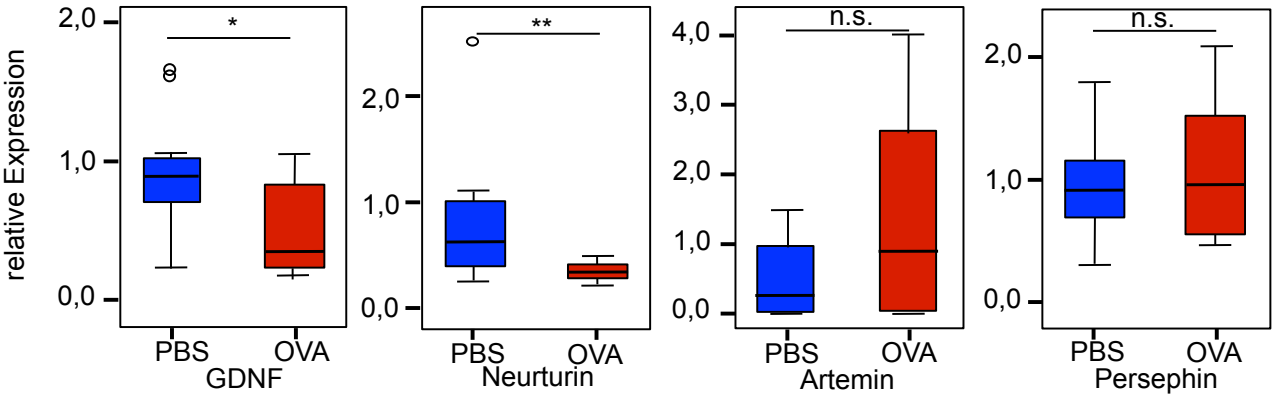

Abbildung 16: **Statistischer Vergleich der mittels qPCR gemessenen mRNA-Expression zwischen PBS- und OVA-Gruppe.**
Die mRNA-Expression von GDNF und Neurturin ist bei Tieren der OVA-Gruppe reduziert, außerdem zeigen sie eine Tendenz zur Steigerung der Artemin mRNA-Expression. Dargestellt ist die relative Expressionsstärke der Zielproteine im Verhältnis zur Expressionsstärke des *Housekeeping*-Gens β-Aktin. Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. Ausreißer werden mit einem kleinen Kreis dargestellt. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; n.s. = nicht signifikant, Mann-Whitney-U-Test, n = 13 (PBS-Gruppe)/n = 12 (OVA-Gruppe).

3.3 Proteinexpression der GFLs

3.3.1 Immunhistochemie

Um die GFLs auch auf Proteinebene in den murinen Geweben nachzuweisen und zu lokalisieren, wurden diese immunhistologisch detektiert (n = 4/Gruppe). Zunächst wurden die verwendeten Antikörper validiert. In den PBS-Kontrollen, in denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde, waren keine Fluoreszenzsignale nachzuweisen. Nach einer Präinkubation der Antikörper mit einem rekombinanten Zielprotein bzw. einem Blocking-Peptid war eine deutliche Schwächung der Signale aller Antikörper in den Epithelien und der glatten Muskulatur von Bronchien und Tracheen und der Basalmembran nachweisbar (Abbildung 17). Diese Kontrollen bestätigen die Fähigkeit der Antikörper, das Peptid bzw. Protein, gegen das sie gerichtet sind, zu binden.

Der GDNF-Antikörper markierte insbesondere das Bronchial- und Trachealepithel (Abbildung 17). Der Neurturin-Antikörper band vor allem an Trachealepithelzellen. Zusätzlich zeigte sich ein deutlich schwächeres Signal des Neurturin-Antikörpers in der glatten Muskulatur (Abbildung 17) und in der Basalmembran des Bronchialepithels (Abbildung 17). Der Antikörper gegen Artemin zeigte vor allem im Epithel von Trachea und Bronchien ein starkes Signal, während der Antikörper gegen Persephin vor allem die glatte Muskulatur von Trachea und Bronchien markierte (Abbildung 17).

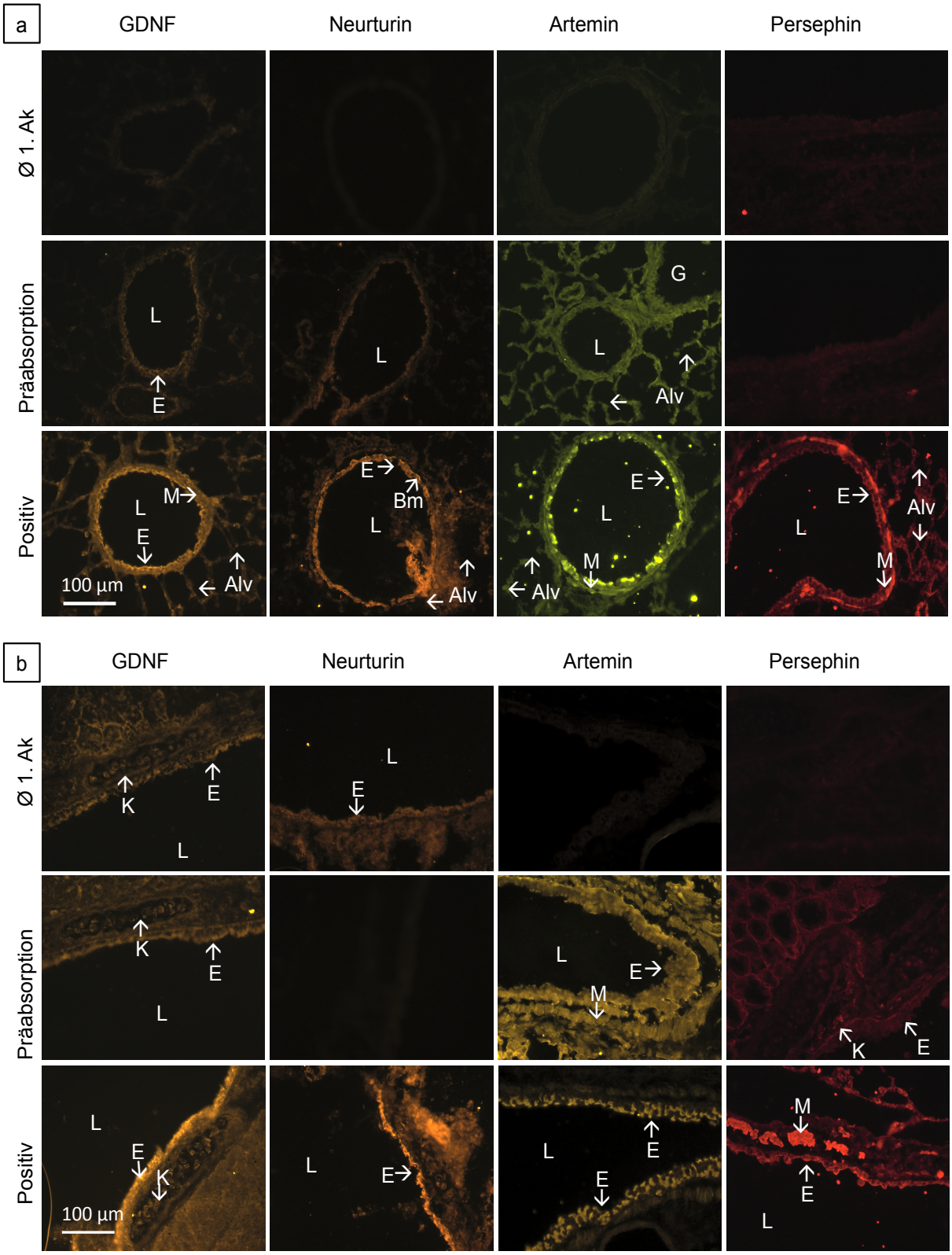

Abbildung 17: **Immunhistologische Untersuchung von Lunge und Trachea.**
GDNF- und Artemin-Antikörper markieren das Bronchial- und Trachealepithel. Der Neurturin-Antikörper bindet ebenfalls an das Trachealepithel sowie an glatte Muskulatur und die Basalmembran des Bronchialepithels. Der Persephin-Antikörper bindet an die glatte Muskulatur der Bronchien; a) Untersuchung an Lungenschnitten; b) Untersuchung an Trachealschnitten; Ø 1. Ak = PBS-Kontrolle (der Primärantikörper wird durch PBS ersetzt), Präabsorption = Präabsorptionskontrolle, Positiv = immunhistologische Färbung der Schnitte, L = Lumen, E = Bronchialepithel, M = glatte Muskulatur, Alv = Alveolargewebe, Bm = Basalmembran des Epithels, G = Blutgefäß.

3.3.2 Veränderung der GFL-Proteinexpression und -Lokalisation im Modell der allergischen Atemwegsentzündung

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ein Unterschied bezüglich des Fluoreszenzmusters zwischen den immunhistochemisch markierten Geweben von Tieren der PBS- und OVA-Gruppe bestand. Dazu wurden erneut Schnitte von je 5 Tieren der PBS- und 5 Tieren der OVA-Gruppe angefertigt und die Expression der GFLs immunhistologisch untersucht. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei einer Veränderung im peribronchialen und perivaskulären Fluoreszenzmuster. In diesen Bereichen ist bei der OVA-Gruppe ein entzündliches, von eosinophilen Granulozyten dominiertes Infiltrat zu erwarten. Die Bilder in Abbildung 18 zeigen exemplarische Ausschnitte von einem Bronchus, der von einem Gefäß begleitet wird, Alveolargewebe und Trachea. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der PBS- einem entsprechenden Bild der OVA-Gruppe gegenübergestellt. Bei keinem der Zielproteine war eine sichtbare Veränderung des Fluoreszenzmusters erkennbar. Insbesondere waren keine zusätzlichen fluoreszenzmarkierten Zellen im perivaskulären und peribronchialen Raum nachweisbar. Die PBS-Kontrollen, in denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde, waren stets negativ (nicht gezeigt, vgl. Abbildung 17).

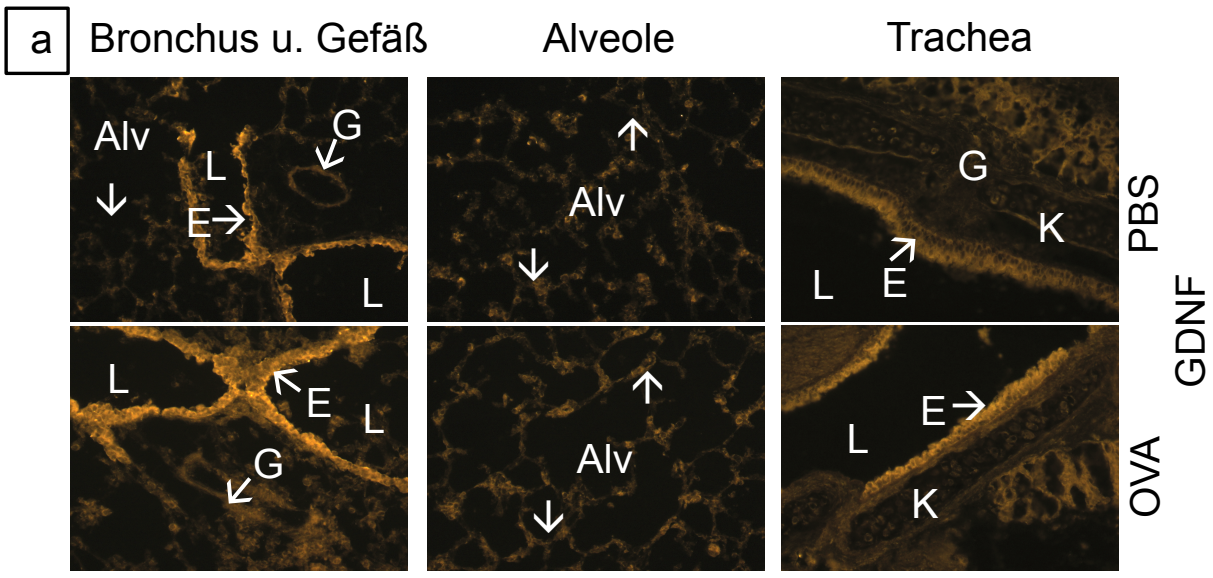

Abbildung 18 a

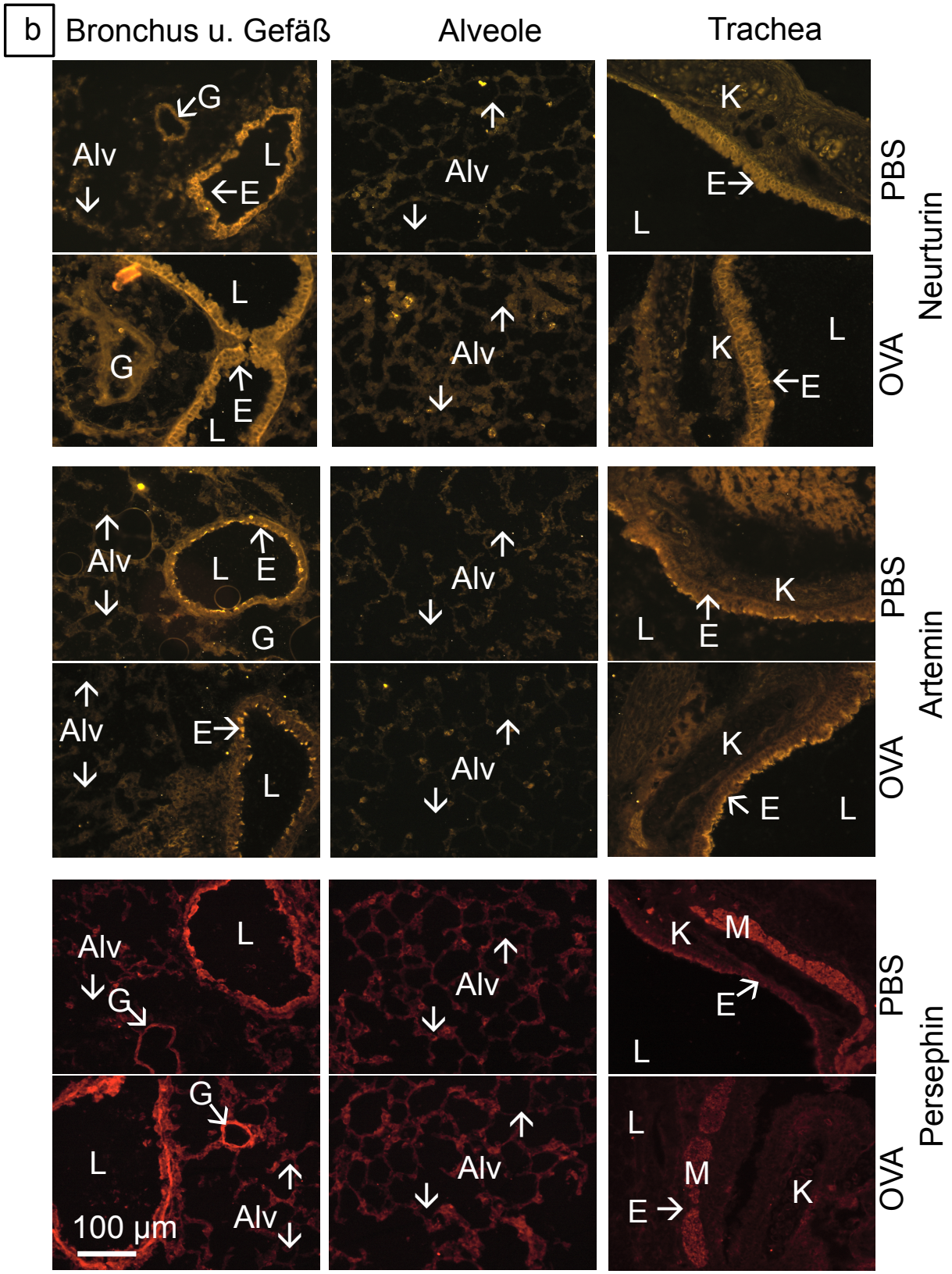

Abbildung 18 a und b: **Immunhistologische Untersuchung der Lungen- und Trachealschnitte aus der PBS- und OVA-Gruppe im Vergleich.**
Die Fluoreszenzmuster der beiden Gruppen unterscheiden sich nicht voneinander. Dargestellt ist je eine repräsentative Abbildung von Bronchus und Gefäß, Alveole und Trachea, pro Zielprotein und Gruppe. a) Immunhistologische Detektion von GDNF; b) Immunhistologische Detektion von Neurturin, Artemin und Persephin. L = Lumen, E = Bronchial-/Trachealepithel, M = glatte Muskulatur, K = Knorpelspange, Alv = Alveolargewebe, G = Blutgefäß.

3.3.3 Quantitative Veränderung der GFL-Proteinexpression im murinen Modell der allergischen Atemwegsentzündung

3.3.3.1 Validierung der Westernblotanalyse

Um die Stärke der Proteinexpression der GFLs zwischen den beiden Versuchsgruppen semiquantitativ zu vergleichen, wurden Westernblot-Analysen von Lungen- und Tracheallysaten durchgeführt. Bei diesen vergleichenden Versuchen wurden GDNF und Artemin untersucht. In Vorversuchen wurde auch Persephin untersucht.

Die Inkubation der Lungen- und Trachealextrakte mit dem Antikörper gegen GDNF ergab ein deutliches Signal in Form einer Doppelbande. Die untere Bande wies eine Größe von ca. 35 kDa und die obere von ca. 40-55 kDa auf. Die Bande des rekombinanten GDNFs wurde durch den Antikörper auf Höhe von ca. 15 kDa detektiert (Abbildung 19-Abbildung 22). Dies entsprach der erwarteten Produktgröße einer Polypeptidkette des Homodimers (Homodimer aus 15,1 kDa großen Polypeptidketten). Die größeren Banden des GDNFs sind möglicherweise durch posttranslationale Modifizierungen des Dimers erklärbar.

Die Detektion des rekombinanten Artemins mit dem Artemin-Antikörper zeigte eine Bande bei ca. 12 kDa, dies entsprach der beschriebenen Produktgröße eines Monomers des Proteins. Die Arteminbanden der Lungen- und Tracheallysate wurden auf Höhe von ca. 24 kDa detektiert. Da Artemin in der Regel als Disulfid vernetztes Homodimer vorliegt, entsprach dies der erwarteten Produktgröße (Abbildung 20).

Zur Validierung der Primärantikörper wurden Präabsorptionskontrollen durchgeführt (Abbildung 19 und Abbildung 20). Diese Kontrollen, bei denen der Primärantikörper vor der Verwendung mit einem Blocking-Peptid inkubiert wurde, bestätigten die Fähigkeit des GDNF-Antikörpers, das Zielprotein zu binden. Bei der Immunmarkierung des Westernblots mit dem GDNF-Antikörper war bei den Gewebeextrakten, die mit dem präabsorbierten Antikörper inkubiert wurden, im Vergleich zu den Gewebeextrakten, die mit dem nicht-präabsorbierten Antikörper inkubiert wurden, eine deutliche Abschwächung des Signals erkennbar (Abbildung 19).

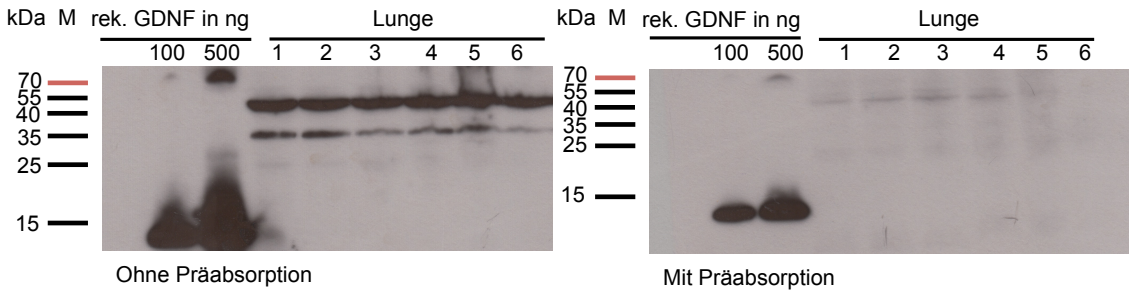

Abbildung 19: **Präabsorptionskontrolle des GDNF-Antikörpers im Westernblot.**
Elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate im 15%igen SDS-Gel; Immundetektion mittels GDNF-Antikörper (links) und einem mit GDNF-Blocking-Peptid präabsorbiertem GDNF-Antikörper (rechts); Markierung durch einen HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Ig Sekundärantikörper. Anschließende Chemilumineszenz-Detektion per Röntgenfilm. Die Präabsorptionskontrolle zeigt eine deutliche Schwächung des Antikörpersignals.. Die Banden des rekombinanten GDNFs wurden auf Höhe der 15 kDa Markierung detektiert. Die Banden der Lungenlysate wurden bei ca. 35 kDa und 40-55 kDa detektiert. rek. GDNF = rekombinantes GDNF, M = Marker in kDa, Lunge 1-6 = Lungenlysate von 6 verschiedenen Mäusen, je 40 µg Gesamtprotein pro Lysat.

Bei der Untersuchung des rekombinanten geblotteten Artemins mit dem Artemin-Antikörper wurde eine Bande auf Höhe von 12 kDa detektiert. Bei Applikation eines Artemin-Antikörpers, der zuvor durch rekombinantes Artemin präabsorbiert wurde, konnte die Bande nicht mehr nachgewiesen werden. Allerdings war das Signal der Lungen- bzw. Tracheallysate bei der Markierung mit dem präabsorbierten Antikörper intensiver als bei den Lysaten, die mit dem nicht-präabsobierten Antikörper detektiert wurden (Abbildung 20). Diese Signalverstärkung war in mehreren Versuchen reproduzierbar und könnte durch eine Vernetzung des zur Präabsorption applizierten, rekombinanten Artemins, das bereits durch den Antikörper gebunden wurde, und den geblotteten Gewebslysaten erklärt werden.

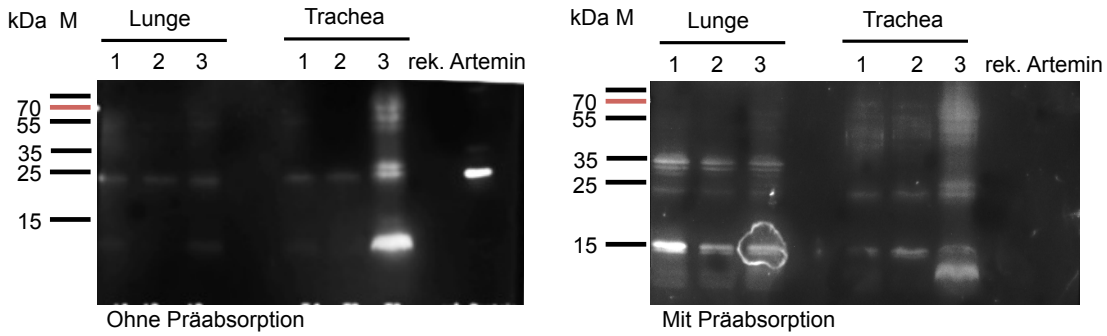

Abbildung 20: **Präabsorptionskontrolle des Artemin-Antikörpers im Westernblot.**
Gelelektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate im 15%igen SDS-Gel; Immundetektion mittels Artemin-Antikörper und präabsorbiertem Artemin-Antikörper (mit rekombinantem Artemin). Markierung durch einen HRP-gekoppelten Ziege-anti-Ratten-Ig Sekundärantikörper. Anschließende Chemilumineszenz-Detektion per Fusion FX7 in inverser Darstellung.
Die Banden des rekombinanten Artemins wurde bei ca. 12 kDa, die der Gewebelysate bei ca. 24 kDa detektiert. Die Präabsorptionskontrolle zeigt das Fehlen der Bande des rekombinanten Artemins bei verstärktem Signal der Lungen- und Trachealbanden. rek. Artemin = 50 ng rekombinantes Artemin, M = Marker in kDa, Lunge/Trachea 1-3 = Lungen-/Tracheallysate von 3 verschiedenen Mäusen; je 40 µg Gesamtprotein pro Lysat.

Zur Validierung der Sekundärantikörper, die in den Westernblots zum semiquantitativen Vergleich der Signalstärken von PBS- und OVA-Gruppe den GDNF- und Artemin-Antikörper detektierten, wurden Vorversuche durchgeführt. Zur Kontrolle des HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Ig Sekundärantikörpers, der an den GDNF-Antikörper band, wurde eine PBS-Kontrolle (PBS statt Primärantikörper; Abbildung 21a) durchgeführt. Zur Kontrolle des HRP-gekoppelten Ziege-anti-Ratten-Ig Sekundärantikörpers, der an den Artemin-Antikörper sowie an den (nur in Vorversuchen genutzten) Persephin-Antikörper band, wurden Kontrollversuche mit absteigenden Proteinkonzentrationen rekombinanten Persephins durchgeführt (Abbildung 21b). Die niedrigste der Proteinkonzentrationen wurde dabei so gewählt, dass sie nicht mehr durch den Primärantikörper detektierbar war.

In der Spur, in der 100 ng rekombinantes Protein aufgetragen wurden, zeigte sich eine einzelne Banden auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von ca. 12 kDa, aber ohne zusätzliche Hintergrundfärbung. In der Spur, in der 50 ng des rekombinanten Persephins aufgetragen wurden, war weder eine Bande, noch ein Hintergrundsignal detektierbar. Aus diesem Grund wurde auf eine zusätzliche PBS-Kontrolle, in der der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde, um zu testen ob der Sekundärantikörper unspezifisch bindet, verzichtet (Abbildung 21b).

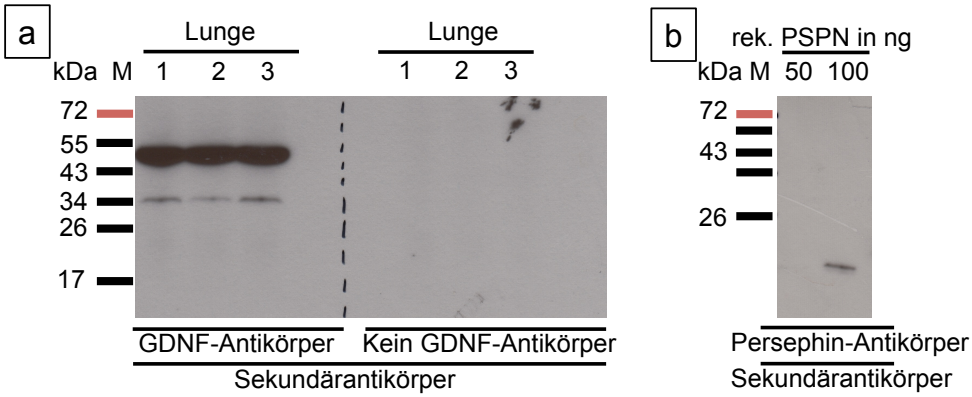

Abbildung 21: **Validierung der Sekundärantikörper im Westernblot.**
Elektrophoretische Auftrennung im 15%igen SDS-Gel, Immundetektion und anschließende Chemilumineszenz-Detektion auf Röntgenfilm. M = Marker in kDa.

a) Bindung der Proteine aus Lungenlysaten mittels Primärantikörper gegen GDNF (links) bzw. PBS-Kontrolle (PBS statt Primärantikörper, rechts) und Markierung mittels HRP-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen-Ig Sekundärantikörper. Der Primärantikörper detektiert Doppelbanden bei ca. 35 und 40-55 kDa. In der PBS-Kontrolle wurde keine Bande detektiert.
L1-3 = Lungenlysate von 3 verschiedenen Mäusen, je 40 µg Gesamtprotein pro Lungenlysat

b) Der Persephin-Antikörper markiert rekombinantes Persephin als Bande auf der erwarteten Höhe bei ca. 12 kDa. Die Detektion erfolgt erst ab einer Konzentration von 100 ng. Bei einer Konzentration von 50 ng ist weder eine Bande, noch ein Hintergrundsignal detektierbar. Es wurde ein HRP-gekoppelter Ziege-anti-Ratten-Ig Sekundärantikörper genutzt, der in den im Folgenden dargestellten Versuchen auch zur Detektion des Artemin-Antikörpers genutzt wurde. rek. PSPN = rekombinantes Persephin (50 ng und 100 ng).

Diese Versuchsergebnisse bestätigen, dass GDNF- und Artemin-Protein in Lunge und Trachea exprimiert werden und sich spezifisch durch die verwendeten Antikörper nachweisen lassen.

3.3.3.2 Semiquantitative Bestimmung der Proteinexpressionsstärke von GDNF und Artemin und ihr Vergleich zwischen PBS- und OVA-Gruppe

Zur semiquantitativen Bestimmung der Proteinexpression wurden Westernblots an Lungenlysaten von je 7 verschiedenen Tieren der PBS- und der OVA-Gruppe mit Antikörpern gegen GDNF bzw. Artemin durchgeführt (Abbildung 22). Um zu testen, ob die Atemwegsinflammation einen Einfluss auf die Proteinsynthese von GDNF und Artemin hat, wurde im Anschluss an die Immundetektion eine Gesamtproteinfärbung mittels Ponceau-Lösung durchgeführt (Abbildung 22) und die Signalintensitäten der Immundetektion und der Gesamtproteinfärbung von 3 Beobachtern mit Hilfe des Image J-Programms unabhängig bestimmt.

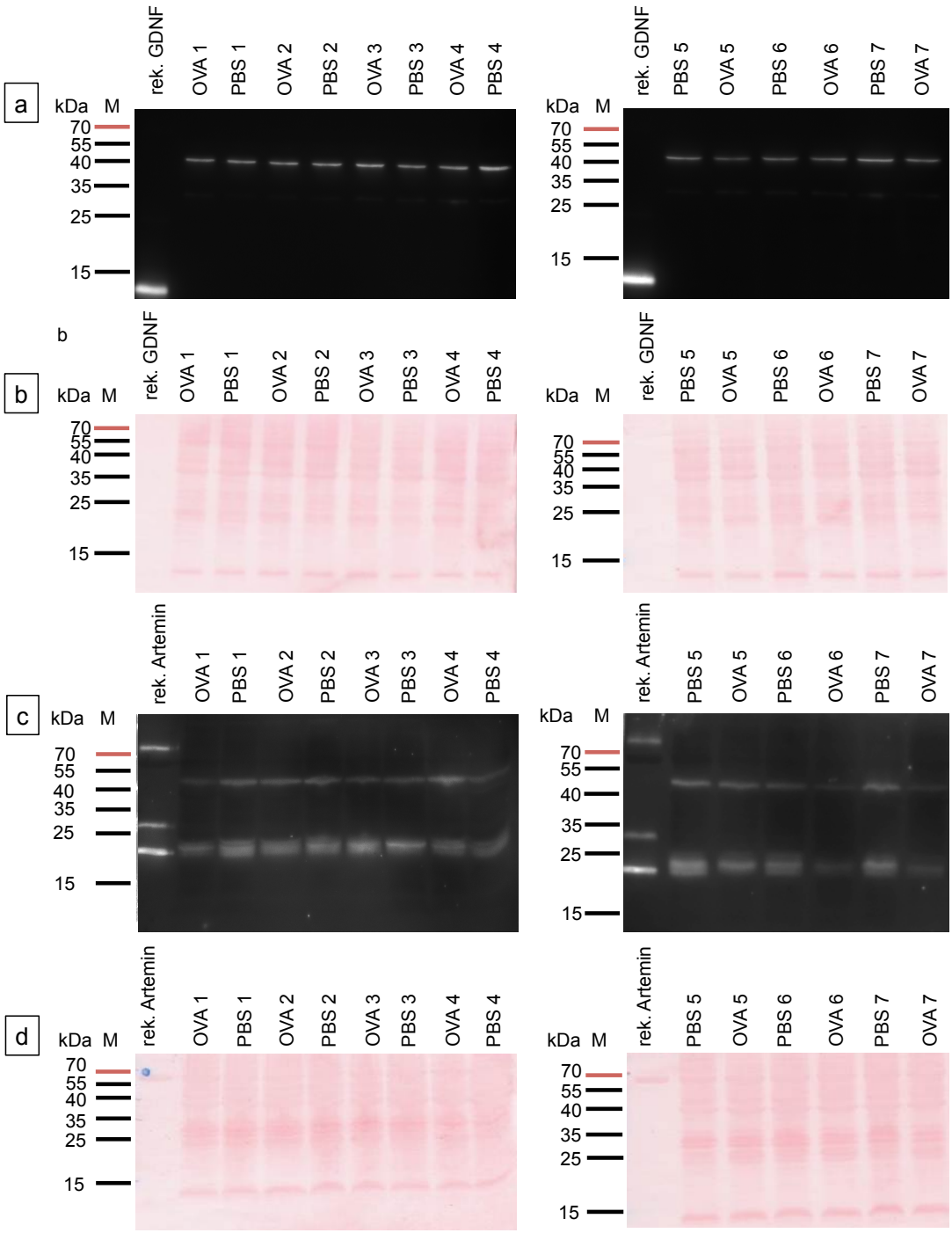

Abbildung 22: **Westernblot und Ponceaufärbung von Lungenlysaten aus der PBS- und OVA-Gruppe.**
a/c) Elektrophoretische Auftrennung der Protein-/Lungenlysate in einem 15%igen SDS-Gel; Immundetektion durch GDNF- und Artemin-Antikörper. Markierung der Primärantikörper mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Kaninchen-Ig (GDNF) und Ziege-anti-Ratten-Ig (Artemin). Anschließende Chemilumineszenz-Detektion per Fusion FX7 in inverser Darstellung. b/d) Ponceaufärbungen aller Proteine der korrespondierenden PVDF-Membranen.
a) Immunodetektion von GDNF (je 20 µg Gesamtprotein pro Lysat).
b) Korrespondierende Ponceaufärbung zu a.
c) Immunodetektion von Artemin (je 40 µg Gesamtprotein pro Lysat).
d) Korrespondierende Ponceaufärbung zu c.
PBS 1-7 = Lungenextrakte der Tiere 1-7 der PBS-Gruppe; OVA 1-7 = Lungenextrakte der Tiere 1-7, der OVA-Gruppe; rek. GDNF/Artemin = rekombinantes GDNF/Artemin je 50 ng.

Ein Quotient aus Antikörper-Signalstärke im Verhältnis zur Gesamtprotein-Signalstärke wurde errechnet. Weder bei den Immunmarkierungen mittels GDNF-Antikörper, noch bei den Immunmarkierungen mittels Artemin-Antikörper, konnte bei einer der Analysen der durch die 3 Beobachter durchgeführten Messungen ein signifikanter Unterschied der Signalstärkenquotienten zwischen den beiden Versuchsgruppen (Tiere der OVA- bzw. PBS-Gruppe) detektiert werden (Abbildung 23) (Mann-Whitney-U-Test; $p > 0,05$).

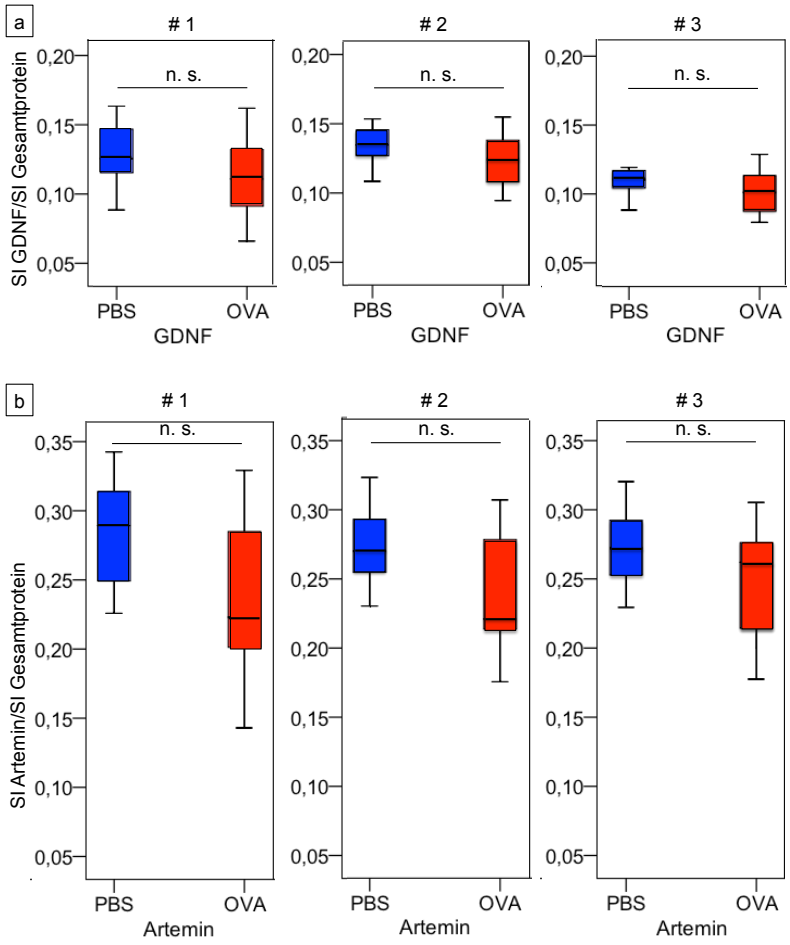

Abbildung 23: **Statistische Auswertung des Vergleiches der Signalstärken der GDNF-/Artemin-Immunmarkierung zwischen PBS- und OVA-Gruppe**.
Die Signalstärke der GDNF- und Artemin-Immunmarkierung bezogen auf die der jeweiligen Gesamtproteinmarkierung weisen beim Vergleich der Ergebnisse von Tieren nach PBS- und OVA-Aerosolprovokation keine Unterschiede auf.
a) Auswertung des Signalstärkenvergleiches der GDNF-Immunmarkierung beider Gruppen.
b) Auswertung des Signalstärkenvergleiches der Artemin-Immunmarkierung beider Gruppen.
Es wurden die Quotienten aus der Signalintensität der Banden, die mit dem GDNF/Artemin-Antikörper markiert wurden, und der jeweiligen Signalintensität der Ponceaufärbung des Gesamtproteins berechnet. Anschließend wurden die Quotienten der Lungenlysate der PBS- und der OVA-Gruppe miteinander verglichen. Die Grafik zeigt die Untersuchungsergebnisse der vergleichenden relativen Quantifizierung der Bandensignalintensitäten/ Gesamtproteinsignalintensität mittels Mann-Whitney-U-Test; $p \leq 0,05$; n.s.= nicht signifikant. Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. # 1-3 = Auswertung von Beobachter 1-3, SI Artemin = Signalintensität der Artemin-Expression, SI GDNF = Signalintensität der GDNF-Expression, SI Gesamtprotein = Signalintensität der Gesamtproteinmarkierung.

3.4 Einfluss der GFLs auf den Anteil der Capsaicin- und Zimtaldehyd-positiven Neurone an der Gesamtneuronenzahl

Auch in den im Folgenden dargestellten Versuchen zur Calciummessung wurde der Fokus auf GDNF und Artemin gelegt. Es wurde statistisch analysiert, wie sich der Anteil der Neurone des Ggl. nodosum, die auf CPS reagieren (CPS^+), in Bezug auf die Gesamtzahl der Neurone, durch die Inkubation in GDNF (50 ng/ml für 24 h) verändert. *Tumor necrosis factor alpha* (TNFα) wurde dabei als Positivkontrolle eingesetzt (Nicol et al., 1997).

Zur Untersuchung des Einflusses von Artemin (50 ng/ml für 24 h) wurde nur die Änderung des prozentualen Anteils der CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare im Bezug auf die Gesamtzahl der Neurone betrachtet, da GFRα3 (der Rezeptor für Artemin) nur in Neuronen dieses Ggl. exprimiert wird (Nassenstein et al., 2010). Als Positivkontrolle für diese Neurone wurde *nerve growth factor* (NGF) genutzt, da *tropomyosin-receptor-kinase*-A (TrkA) (der hochaffine Rezeptor für NGF) primär auf den Zellen des Ggl. jugulare exprimiert wird (Shu & Mendell, 2001; Nassenstein et al., 2010).

Die Inkubation mit GDNF bewirkte im Vergleich zur Inkubation mit dem Kontrollmedium (K; L-15 Medium) eine signifikante Abnahme der Anzahl der CPS-reaktiven Neurone und bewirkte somit das gleiche Ergebnis wie die Positivkontrolle TNFα ($p \leq 0,05$; χ^2-Test; Abbildung 24a). Bei den Neuronen, die mit Artemin inkubiert wurden, zeigte sich hingegen keine Veränderung des prozentualen Anteils der CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare (α,β-Methylene-ATP^-) an der Gesamtzahl der Neurone. Die Inkubation mit der Positivkontrolle NGF bewirkte ebenfalls keine Veränderung (Abbildung 24b).

Zusätzlich wurde nach den Inkubationen auch die Anzahl der ZA^+ Neurone bezogen auf die CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare (α,β-Methylene-ATP^-) oder des Ggl. nodosum α,β-Methylene-ATP^+) ermittelt. Bei den Neuronen, die mit GDNF inkubiert wurden, war keine Veränderung der Anzahl der ZA^+ Neurone im Bezug auf die Anzahl der CPS^+ Neurone des Ggl. nodosum nachweisbar. Dies galt ebenfalls für die Positivkontrolle TNFα (Abbildung 24c). Der Anteil der ZA^+, bezogen auf die CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare, stieg signifikant bei den Neuronen, die mit Artemin inkubiert oder Neuronen, die mit der Positivkontrolle NGF inkubiert wurden ($p \leq 0,05$; χ^2-Test; Abbildung 24d).

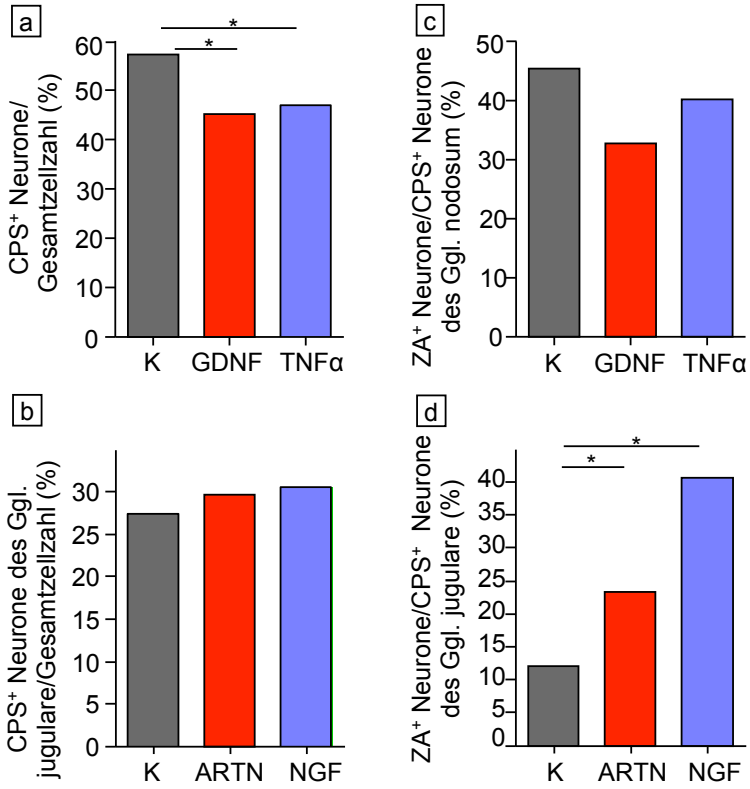

Abbildung 24: **Statistische Auswertung des Einflusses von GDNF und Artemin auf die prozentualen Anteile CPS- und ZA-reaktiven Neurone.**
GDNF senkt den Anteil der CPS^+-, Artemin erhöht den Anteil der ZA^+-Neurone.
a) Der Anteil der CPS^+ Neurone an der GZZ wird durch GDNF signifikant vermindert.
b) Der Anteil der CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare an der GZZ wird durch Artemin nicht verändert.
c) Der Anteil der ZA^+ an den CPS^+ Neuronen des Ggl. nodosum wird durch GDNF nicht verändert.
d) Der Anteil der ZA^+ an den CPS^+ Neuronen des Ggl. jugulare wird durch Artemin erhöht.
Die Untersuchungen wurden im Vergleich zu einer 24-stündigen Inkubation mit Kontrollmedium (L-15 Medium) durchgeführt. CPS = Capsaicin, ZA = Zimtaldehyd, GDNF = 50 ng/ml GDNF, ARTN = 50 ng/ml Artemin, TNFα = 50 ng/ml *tumor necrosis factor α*, NGF = 50 ng/ml *nerve growth factor.*
* = $p \leq 0{,}05$ (χ^2–test); Artemin: n = 402-909 Zellen/Stimulus; GDNF: n = 393-498 Zellen/Stimulus.

3.5 Einfluss der GFLs auf den intrazellulären Calciumanstieg

Zur Untersuchung des Einflusses von GDNF und Artemin auf den CPS-abhängigen Anstieg des intrazellulären Calciums ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) wurden Neurone aus den vagalen Ganglien für 4 h oder 24 h mit rekombinantem GDNF, Artemin, TNFα, NGF (je 50 ng/ml) oder zur Kontrolle in L-15 Medium inkubiert. Anschließend wurden entweder die Neurone aus dem Ggl. nodosum (α,β-Methylene-ATP^+) oder dem Ggl. jugulare (α,β-Methylene-ATP^-) analysiert.

Die Inkubation mit GDNF über 4 h erbrachte eine statistisch signifikante Änderung des $\Delta[Ca^{2+}]_i$ bei der Stimulation mit 30 nM Capsaicin (Abbildung 25; obere Reihe). Hingegen zeigte die Inkubation über 24 h in allen 3 CPS-Konzentrationen eine signifikante Verminderung des $\Delta[Ca^{2+}]_i$. Pro Stimulation wurden zwischen 22 und 142 Zellen ausgewertet (Abbildung 25).

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass die Inkubation der α,β-Methylene-ATP$^+$/CPS$^+$ Neurone mit GDNF deren funktionelle Eigenschaften veränderte und eine verringerte, CPS-abhängige Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt.

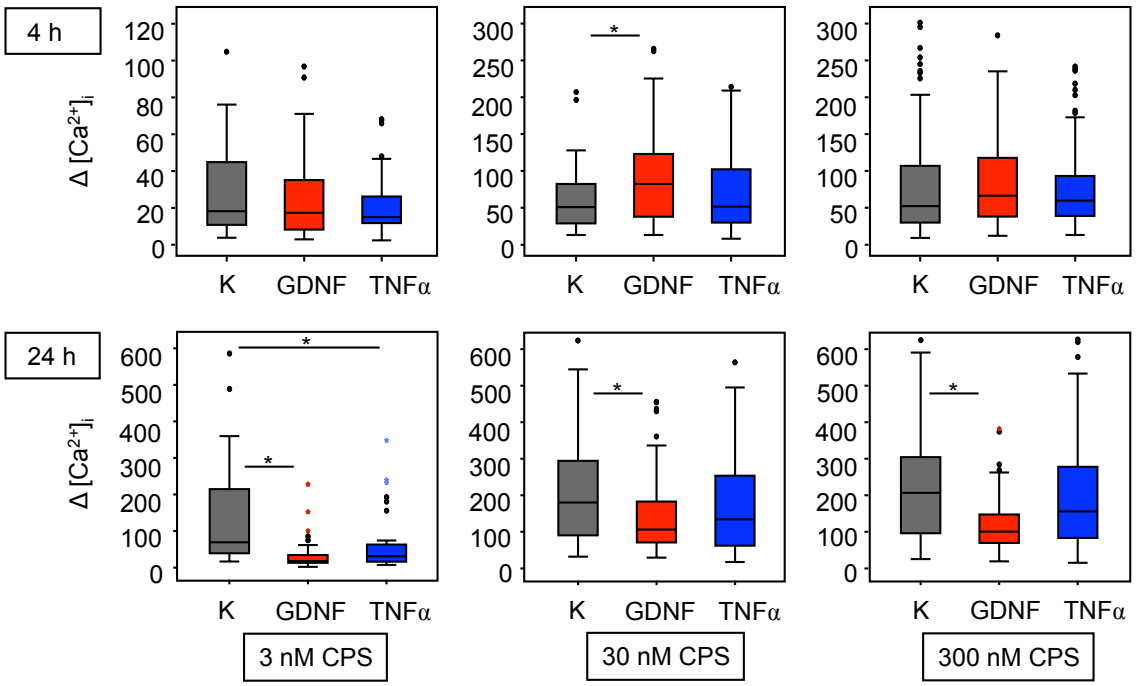

Abbildung 25: **Statistische Auswertung des Einflusses der GDNF-Inkubation für 4 h und 24 h, auf das CPS-abhängige Δ[Ca^{2+}]$_i$ der CPS$^+$ Neurone des Ggl. nodosum.**
Das CPS-abhängige Δ[Ca^{2+}]$_i$ der CPS$^+$ Neurone des Ggl. nodosum ist nach 24 h Inkubation mit GDNF in allen 3 CPS-Konzentrationen signifikant erniedrigt.
Nach 4 h Inkubation ist das CPS-abhängige Δ[Ca^{2+}]$_i$ bei einer Stimulation mit 30 nM CPS signifikant erhöht. Dissoziierte Neurone des Ggl. jugulare/nodosum wurden für 4 h und 24 h in Kontrollmedium (K; L-15/10% FBS/2% Penicillin/Streptomycin), GDNF (50 ng/ml) oder TNFα (50 ng/ml) inkubiert und mit Fura-2-AM beladen. Anschließend wurden sie unter anderem mit α,β-Methylene-ATP und 3 verschiedenen Konzentrationen CPS stimuliert. Je 30 s vor und nach der Stimulation wurde die Fluoreszenz-Ratio (340/380) der Neurone alle 2 s gemessen. Die Differenz der Fluoreszenz-Ratio vor (Baseline) und nach der Stimulation wurde in den CPS$^+$ Neuronen des Ggl. nodosum (α,β-Methylene-ATP$^+$/CPS$^+$) bestimmt und als Δ[Ca^{2+}]$_i$ bezeichnet. Anschließend wurden mittels Mann-Whitney-U-Test die Δ[Ca^{2+}]$_i$-Werte der Zellen, die in Kontrollmedium inkubiert wurden, mit den Δ[Ca^{2+}]$_i$-Werten der Zellen, die in GDNF und TNFα inkubiert wurden, verglichen. Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. Ausreißer werden mit einem kleinen Kreis dargestellt. n = 22-142 Zellen/Stimulus; * = p ≤ 0,05.

Zur Analyse des Einflusses der Artemin-Inkubation wurden nur CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare ausgewertet (α,β-Methylene-ATP$^-$, CPS$^+$). Beim Vergleich der CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare, die für 4 h mit Artemin inkubiert wurden, mit denen, die mit Kontrollmedium inkubiert wurden, konnte ein signifikant erhöhtes Δ[Ca^{2+}]$_i$ bei Stimulation der Zellen mit 30 und 300 nM CPS nachgewiesen werden (p ≤ 0,05; Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 26).

Bei den Zellen, die für 24 h in Artemin und Kontrollmedium inkubiert wurden, war nur der Unterschied des $\Delta[Ca^{2+}]_i$ in Folge der Stimulation mit 300 nM CPS statistisch signifikant erhöht ($p \leq 0,05$, Mann-Whitney-U-Test; Abbildung 26). Pro Stimulation wurden zwischen 12 und 168 Zellen ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass die Inkubation der α,β-Methylene-ATP$^-$/CPS$^+$ Neurone mit Artemin deren funktionelle Eigenschaften veränderte und eine erhöhte, CPS-abhängige Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt.

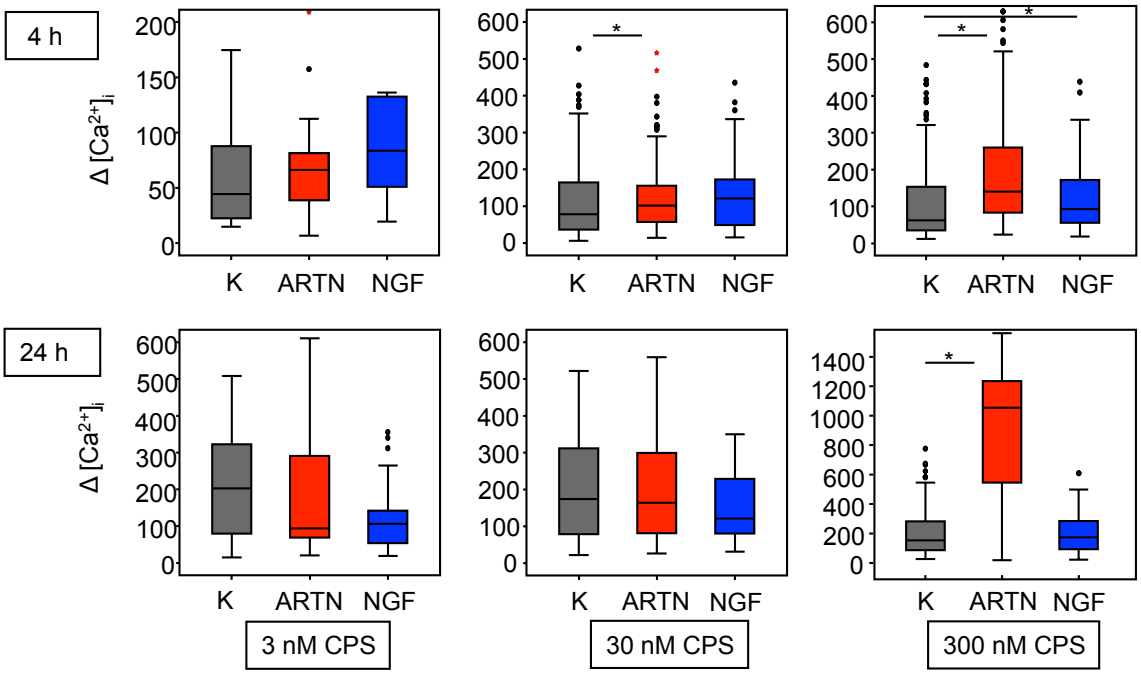

Abbildung 26: **Statistische Auswertung des Einflusses der Artemin-Inkubation für 4 h und 24 h, auf das CPS-abhängige $\Delta[Ca^{2+}]_i$ der CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare.**
Das CPS-abhängige $\Delta[Ca^{2+}]_i$ der CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare ist nach 4 h und 24 h Inkubation in Artemin in Abhängigkeit der CPS-Konzentrationen signifikant erhöht.
CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare, die für 4 h in Artemin inkubiert wurden, haben ein signifikant höheres $\Delta[Ca^{2+}]_i$ der Zellen gegenüber den Neuronen, die in Kontrollmedium inkubiert wurden, bei der Stimulation mit 30 nM CPS und 300 nM CPS. Auf die Stimulation mit 300 nM CPS reagieren auch die CPS$^+$ Neurone des Ggl. jugulare, die für 24 h in Artemin inkubiert wurden, mit einem signifikant höheren $\Delta[Ca^{2+}]_i$.
Dissoziierte Neurone des Ggl. jugulare/nodosum wurden für 4 h und 24 h in Kontrollmedium (K; L-15/10% FBS/2% Penicillin/Streptomycin), Artemin (50 ng/ml; ARTN) oder NGF (50 ng/ml) inkubiert und mit Fura-2-AM beladen. Anschließend wurden sie unter anderem mit α,β-Methylene-ATP und 3 ansteigende Konzentrationen CPS stimuliert. Je 30 s vor und nach der Stimulation wurde die Fluoreszenz-Ratio (340/380) der Neurone alle 2 s gemessen. Die Differenz der Fluoreszenz-Ratio vor (Baseline) und nach der Stimulation wurde in den CPS$^+$ Neuronen des Ggl. jugulare (α,β-Methylene-ATP$^-$/CPS$^+$) bestimmt und als $\Delta[Ca^{2+}]_i$ bezeichnet. Anschließend wurden mittels Mann-Whitney-U-Test die $\Delta[Ca^{2+}]_i$-Werte der Zellen, die in Kontrollmedium inkubiert wurden, mit den $\Delta[Ca^{2+}]_i$-Werten der Zellen, die in Artemin und NGF inkubiert wurden, verglichen; Die Boxplots zeigen Minimum, Median und Maximum, sowie die 25. und 75. Perzentile. Ausreißer werden mit einem kleinen Kreis dargestellt. n = 12-168 Zellen/Stimulus; * = $p \leq 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Die Induktion einer allergischen Atemwegsinflammation im Mausmodell des Asthma bronchiale

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass die GFL-Expression bei Tieren mit allergischer Atemwegsinflammation verändert ist. Die veränderte GFL-Expression könnte Einfluss auf die atemwegsinnervierenden C-Faserneurone haben und die AHR sowie die zentrale Reflexaktivität, die beim Asthmaanfall gesteigert vorhanden sind und zu Husten, Bronchokonstriktion usw. führen, begünstigt werden.

Um Veränderungen der GFL-Expression auf mRNA- und Proteinebene bei allergischer Atemwegsinflammation zu untersuchen, wurde ein Modell der Atemwegsinflammation genutzt. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung ist ein seit vielen Jahren etabliertes, häufig beschriebenes und akzeptiertes Modell (Herz et al., 1998; Päth et al., 2002; Nassenstein et al., 2006; Weigt et al., 2005). In unserem Labor wurde das beschriebene Modell bereits in einem vorherigen Projekt etabliert (Böhmer, 2016) Der Erfolg der Induktion einer Atemwegsinflammation wurde in der Vergangenheit in unterschiedlichen Publikationen auf verschiedene Arten belegt. Dabei kamen intrakutane Allergietests, Messungen der totalen und der OVA-spezifischen IgE-Spiegel im Serum sowie der Zytokin-Spiegel von IL-4, IL-5 und Interferon-γ aus der BALF mittels *enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA), Zelldifferenzierungen der BALF-Zellen und histologische Untersuchungen zum Einsatz. Zudem wurden Untersuchungen der Reaktivität der glatten Muskulatur der Atemwege auf eine elektrische Feldstimulation sowie Lungenfunktionsmessungen per *head-out-Bodyplethysmographie* nach Stimulation mit Methacholin und Capsaicin durchgeführt, die beim Asthma charakteristische Veränderungen zeigen. (Herz et al., 1998; Päth et al., 2002; Nassenstein et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Differentialzytologie der BALF zum Nachweis der Atemwegsentzündung genutzt. Zur Etablierung des Modells in unserem Labor konnte in einem anderen Projekt zusätzlich die Leukozyteninfiltration durch histologische Färbung von Paraffinschnitten nachgewiesen werden (Böhmer, 2016).

Die signifikant erhöhte Gesamtzellzahl und im Besonderen der sehr viel höhere Anteil der eosinophilen Granulozyten in der OVA-Gruppe (89,2%) gegenüber der PBS-Gruppe (2,36%) entsprechen dem zu erwartenden Ergebnis bei erfolgreicher Induktion der allergischen, eosinophilen Atemwegsinflammation, wie es in ähnlicher Weise in der Literatur beschrieben wurde (Herz et al., 1998; Päth et al., 2002; Nassenstein et al., 2006). Die in dieser Arbeit genutzte Kontroll/PBS-Gruppe weist ein physiologisches Leukozytenmuster in der BALF auf. Dies zeigt, dass die Sensibilisierung der Tiere

alleine nicht zur Induktion einer Atemwegsinflammation führt. Erst die Sensibilisierung und Allergenprovokation mit OVA führte in unseren Versuchen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des prozentualen Anteils der Eosinophilen sowie, in deutlich geringerem Maße, der Neutrophilen und Lymphozyten. Mit der deutlichen Eosinophilie der Tiere der OVA-Gruppe konnte in unseren Versuchen ein charakteristisches Merkmal der allergischen Atemwegsentzündung nachgewiesen werden.

4.2 Der Nachweis der GFL-Rezeptoren und von TRPV1 in den sensiblen Ganglien des N. vagus

Es wurde die Hypothese untersucht, dass die GFLs Einfluss auf die lungeninnervierenden C-Faserneurone und die auf ihnen exprimierten TRP-Kanäle nehmen und dadurch die Sensibilität dieser Neurone auf bestimmte Umweltirritantien steigern. Dies könnte zur AHR und reflektorisch bedingten Asthmasymptomen beitragen. Hintergrund dieser Überlegung ist der Nachweis der Co-Expression von GFRα1-4, den spezifischen Rezeptoren der 4 GFLs, sowie ihrem Co-Rezeptor RET und TRPV1 in Perikarya der atemwegsinnervierenden C-Faserneuronen des Ggl. jugulare/nodosum (Nassenstein et al., 2010). Die Expression dieser Rezeptoren ist eine Voraussetzung dafür, dass die GFLs die C-Faserneurone beeinflussen können. Da die mRNA-Expression dieser Rezeptoren für die vorliegende Arbeit von großem Interesse ist, wurde sie im Ggl. jugulare/nodosum untersucht. Es konnte der Nachweis der Expression von GFRα1-4, RET und TRPV1 im Ggl. jugulare/nodosum erbracht werden und so die Ergebnisse von Nassenstein et al. in vereinfachter Form bestätigt werden. Da die meisten C-Faserneurone TRPV1 exprimieren und daher auf eine Stimulation mit Capsaicin reagieren und diese Reaktion als sehr spezifisch für C-Faserneurone angesehen wird (Lee et al., 2003; Fox et al., 1993), wird bei Nassenstein et al. 2010 genau wie in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass es sich bei Neuronen, die TRPV1 exprimieren bzw. die auf CPS reagieren, um C-Faserneurone handelt.

Ähnliche Ergebnisse wie bei Nassenstein et al. konnten von Lieu et al. gezeigt werden, dazu wurden jedoch Versuche an Meerschweinchen an Stelle von Mäusen durchgeführt (Lieu et al., 2011). In beiden Studien wurde gezeigt, dass fast alle vagalen sensiblen atemwegsinnervierende Neurone RET exprimieren (Nassenstein et al., 2010; Lieu et al., 2011). GFRα1 wurde in fast allen C-Faserneuronen des Ggl. nodosum und in der non-peptidergen Subpopulation des murinen Ggl. jugulare nachgewiesen (Nassenstein et al., 2010). GFRα2 wurde in ca. 50% aller lungeninnervierenden $TRPV1^+$-Zellen von Meerschweinchen und in ca. 13% bzw. ca. 26% der entsprechenden Neurone des murinen Ggl. jugulare bzw. nodosum

nachgewiesen (Lieu et al., 2011; Nassenstein et al., 2010). Die größte Diskrepanz in den Ergebnissen beider Studien zeigte sich jedoch bei der Untersuchung der Expression des GFRα3. In der Untersuchung des murinen Materials wurde die Expression von GFRα3 ausschließlich in einer Subpopulation der C-Faserneurone des Ggl. jugulare (peptiderg) nachgewiesen (Nassenstein et al., 2010). Bei der Analyse der Neurone von Meerschweinchen hingegen wurde die GFRα3-Expression auch in ca. 70% der C-Faserneurone des Ggl. nodosum nachgewiesen (Lieu et al., 2011).
Da beide Autoren retrograd markierte bronchopulmonale Neurone unter dem Fluoreszenzmikroskop isoliert und die mRNA-Expression von einzelnen Zellen per RT-PCR untersucht haben, liegt der größte Unterschied beider Studien – wie bereits von Lieu et al. diskutiert – wohl in den unterschiedlichen untersuchten Spezies.

Obwohl die Ergebnisse beider Studien im Bezug auf die Expression von GFRα3 im Ggl. jugulare/nodosum widersprüchlich sind, scheint die Studie von Nassenstein et al. plausibler, da die spezifische GFRα3-Expression im Ggl. jugulare nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch mittels Immunhistochemie auf Proteinebene gezeigt wurde. Die Tatsache, dass in dieser wie in unserer Studie Mäuse untersucht wurden, unterstreicht die Relevanz dieser Studie für unsere weiteren Untersuchungen.

4.3 Die Expression der GFLs in den Atemwegen und ihre Regulation bei allergischer Atemwegsinflammation

Damit die GFLs auf die lungeninnervierenden Neurone Einfluss nehmen können, müssen sie von Zellen in unmittelbarer Umgebung der Neurone exprimiert werden. Das bedeutet, dass sie entweder im Sinne einer autokrinen Wirkung durch die Neurone im innervierten Organ synthetisiert werden müssen, oder alternativ im Sinne einer parakrinen Wirkung durch benachbarte Zellen, wie z.B. Epithelzellen gebildet werden müssen. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression der GFLs im Gewebe der Atemwege analysiert. In weiteren Versuchen wurde zudem untersucht, ob sich die Expression der GFLs bei der allergischen Atemwegsinflammation verändert. Mit diesem Vorgehen wurde die Hypothese geprüft, dass eine solche Veränderung stattfindet, womit die AHR sowie zentrale und periphere Reflexe, die die Symptome des Asthmaanfalls bewirken, begünstigt werden könnten.

Die Expression der 4 GFLs wurde in dieser Arbeit mit mehreren Methoden auf unterschiedlichen Stufen der Synthese bewiesen. Mittels RT-PCR konnte die mRNA-Synthese der GFLs in den Lungen und Tracheen nachgewiesen und quantifiziert werden. Dabei konnte die Expression von GDNF, Neurturin und Artemin in je 10 von

10, die von Persephin in 6 von 10 Lungen belegt werden. GDNF-, Artemin- und Persephin-mRNA konnte in 10 von 10, Neurturin-mRNA in 9 von 10 Tracheen detektiert werden. Zudem konnten die GFLs in je 13 Tieren der PBS- und 12 Tieren der OVA-Gruppe mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass die GFL-Expression bei einer allergischen Atemwegsinflammation verändert ist, konnte in unseren Experimenten mittels quantitativer RT-PCR ebenfalls bestätigt werden. Dabei konnte eine signifikante Herabregulation der mRNA-Expression von GDNF- und Neurturin-mRNA in den Atemwegen der Tiere der OVA-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe belegt werden. Die Artemin-Expression war in der OVA-Gruppe tendenziell aber nicht signifikant erhöht, während die Persephin-Expression keinen Unterschied zwischen beiden Gruppen aufwies.
Durch Westernblotanalysen und Immunhistologie konnte die GFL-Synthese auf Proteinebene in Lungen- bzw. Tracheallysaten und deren Lokalisation in den entsprechenden Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Dabei wurde die Expression der 4 GFLs in Lungen- und Trachealschnitten von je 4 verschiedenen Tieren belegt. Zusätzlich konnte der immunhistologische Nachweis der 4 GFLs bei 5 Tieren der PBS- und 5 Tieren der OVA-Gruppe erbracht werden. GDNF und Artemin konnten zudem mittels Westernblot in je 7 Tieren der PBS- und 7 Tieren der OVA-Gruppe detektiert werden.

Eine veränderte Protein-Expression von GDNF und Artemin in der OVA-Gruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe konnte in der vorliegenden Arbeit bei der semiquantitativen Analyse der Westernblotbanden allerdings nicht festgestellt werden. In den immunhistochemischen Färbungen war ebenfalls kein Unterschied zwischen den Fluoreszenzmustern beider Versuchsgruppen zu erkennen. Auf eine semiquantiative Analyse der Signalstärken in den histologischen Schnitten wurde bewusst verzichtet. Diese Entscheidung wurde aufgrund der Erfahrung mit unseren qualitativen immunhistochemischen Versuchen, bei denen relativ breite Schwankungen der Signalstärken zwischen den einzelnen Tieren der PBS- bzw OVA-Gruppe und zwischen verschiedenen Versuchsreihen auftraten und der daher mangelnden Validität der Methode begründet.
Zur Validierung unserer Ergebnisse wurden je nach angewandter Methode verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zur Absicherung der PCR-Ergebnisse wurden Wasser- und -RT-Kontrollen untersucht. Diese waren bei allen durchgeführten Versuchen negativ. Zum Ausschluss der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers bei den immunhistologischen Untersuchungen hingegen wurden PBS-Kontrollen, bei denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde,

durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierungen, die in den immunhistologisch detektierten Schnitten zu sehen waren, fehlten in den PBS-Kontrollen vollständig. Sie waren in den Präabsorptionskontrollen, bei denen der Primärantikörper mit dem Peptid/rekombinanten Protein, gegen das er gerichtet war, zusammen appliziert wurden, deutlich geschwächt. Die gleichen Ergebnisse zeigten auch die Kontrollen für die GDNF-Immundetektion in den elektrophoretisch aufgetrennten Lungen- und Tracheallysaten der Westernblotversuche.

Bei den Untersuchungen zur Artemin-Detektion mittels Westernblot kam es hingegen zu einer Verstärkung des Signals in den elektrophoretisch aufgetrennten Gewebelysaten durch die Präabsorption des Primärantikörpers. Die Bande des rekombinanten Artemins war jedoch nicht mehr detektierbar. Eine mögliche Erklärung ist eine Bindung des zur Präabsorption genutzten rekombinanten Artemins an die Proteine auf der Membran und deren Markierung mit dem Sekundärantikörper. Dies würde zu einem unspezifischen hohen Hintergrundsignal führen, wie es in den Präabsorptionskontrollen zu sehen war. Für diesen Erklärungsversuch spricht die Tatsache, dass in der gesamten Spur des rekombinanten Proteins kein Signal detektierbar war. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass das rekombinante Artemin, das zur Präabsorption zum Antikörper gegeben wurde, alle Bindungsstellen des Antikörpers besetzt hatte und dieser das rekombinante Artemin auf der Membran nicht mehr binden konnte. Da aber außer dem rekombinanten Artemin keine weiteren Proteine in der Spur vorhanden waren, konnte der Komplex aus Artemin und Artemin-Antikörper kein anderes Protein binden. In den Spuren mit den Lungenlysaten sind hingegen viele andere Proteine in der Membran gebunden, so dass es zur Kreuzreaktion kommen kann und ein verstärktes unspezifisches Hintergrundsignal detektiert wird.

Einen weiteren Hinweis zur Spezifität des Antikörpers gegen Artemin gibt das nachgewiesene Molekulargewicht von ca. 24 kDa, da es genau dem Gewicht eines Artemin-Dimers entspricht. Die durch den GDNF-Antikörper detektierten Banden entsprechen nicht exakt dem erwarteten Molekulargewicht. Die leichtere Bande hat ein Gewicht von ca. 35 kDa und die schwerere von ca. 40-55 kDa. Ein GDNF-Monomer weist ca. 15 kDa auf. Es wurde beschrieben, dass durch eine Deglykosilierung das Molekulargewicht von ca. 20 kDa auf 15 kDa gesenkt werden kann (Lin et al., 1993). Die kleinere Bande könnte also eventuell ein glykosiliertes Dimer darstellen. Da aber die Bande des rekombinanten Proteins genau der erwarteten Größe eines GDNF-Monomers entspricht, der Antikörper diese Bande klar detektierte und in der Präabsorptionskontrolle keinerlei Banden mehr detektiert werden konnten, ist von einer spezifischen Bindung des Antikörpers an GDNF auszugehen. Zur endgültigen

Überprüfung der Spezifität des Antikörpers sind Kontrolluntersuchungen an GDNF-knock-out-Mäusen erforderlich, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht verfügbar waren.

Bei Betrachtung der Untersuchungsergebnisse zur inflammationsabhängigen Regulation der GFL-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene fällt auf, dass die mRNA-Expression von GDNF und Neurturin durch die Atemwegsinflammation signifikant herabreguliert wurde, während für keines der 4 GFLs eine Regulation auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte.
Eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen unserer Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene könnte in den unterschiedlichen Sensibilitäten der einzelnen Nachweisverfahren gesucht werden. Vorstellbar ist aber auch, dass es durch unterschiedliche Kinetiken der verschiedenen Expressionsebenen zu verschieden regulierten Expressionen der mRNA und der Proteine kommt. So ist es z.B. möglich, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung die mRNA-Expression deutlich reguliert ist, die Protein-Expression aber noch nicht in einem detektierbaren Maß verändert wurde. In unseren Versuchen könnte zum Untersuchungszeitpunkt 24 h nach der letzten Allergenprovokation die mRNA Synthese bereits reguliert worden sein, während sich die Proteinsynthese noch auf dem gleichen Niveau wie bei den Tieren ohne Atemwegsinflammation befand.
Auch eine Beeinflussung der Ergebnisse aufgrund der Sekretion der Proteine (Lonka-Nevalaita et al., 2010) sollte bedacht werden. Es ist durchaus vorstellbar, dass die Proteine nicht durch die immunhistochemischen Untersuchungen zu detektieren waren, weil sie bereits ins Lumen abgegeben wurden oder mit dem Blutstrom, dem Zilienschlag oder retrograd axonal abtransportiert wurden. Die sekretierten GFL-Proteine sind vermutlich mit der bronchoalveolären Lavage und den Waschschritten und Inkubationen ausgewaschen worden, während die mRNA in den Zellen verblieb und nachgewiesen werden konnte.
Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Ergebniskonstellation ist ein retrograder axonaler Transport der Proteine, wie er von anderen Nervenwachstumsfaktoren, z.B. den Neurotrophinen, bereits bekannt ist. Der Transport von NGF wurde z.B. in sensiblen Neuronen (Stoeckel et al., 1975) und der von NGF, *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Neurotrophin 3 (NT3) auch in DRGs bereits vor langer Zeit beschrieben (DiStefano et al., 1992).
Auch für einige GFLs konnte die Möglichkeit des retrograden axonalen Transportes bereits in verschiedenen Neuronenpopulationen verifiziert werden. In dopaminergen Neuronen im Striatum konnte beispielsweise der retrograde Transport von GDNF

detektiert werden (Tomac et al., 1995). In sensiblen Neuronen der DRGs adulter Ratten konnte sowohl der Transport von GDNF als auch der von Neurturin nachgewiesen werden (Leitner et al., 1999). Auch für Artemin wurde ein solcher Transport bereits von anderen Autoren vermutet (Elitt et al., 2006).

Verschiedene Veröffentlichungen stützen die in unseren Versuchen nachgewiesene mRNA-Expression von GDNF, Neurturin, Artemin und Persephin in Lungen und Tracheen von Mäusen. So konnte gezeigt werden, dass GDNF-mRNA in der Lunge der Ratte exprimiert wird und dass die Expressionsstärke abhängig von der Entwicklung ist. Zum Zeitpunkt rund um die Geburt und in der dritten postnatalen Woche wurde die stärkste Expression gemessen. Im Mittel nahm die GDNF-mRNA-Expression im Laufe der Entwicklung zu (Trupp et al., 1995). Auch für die Neurturin-mRNA-Expression in der murinen Lunge konnte eine geringfügige Zunahme während der embryologischen Entwicklung nachgewiesen werden. Die stärkste mRNA-Expression konnte in der adulten Maus festgestellt werden (Golden et al., 1999). In anderen peripheren Geweben konnte Neurturin-mRNA ebenfalls in schwachem bis moderatem Ausmaß in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien (E17-E20) detektiert werden (Widenfalk et al., 1997).
Beim Vergleich der Artemin-Expression in unterschiedlichen adulten humanen Geweben wurde die stärkste Expression in Plazenta und Hypophyse sowie in der Trachea nachgewiesen. Bei Untersuchungen von fetalen humanen Geweben wurde die Artemin-mRNA-Expression am stärksten in Lunge und Niere detektiert. Insgesamt war die Expression im adulten Gewebe relativ schwach (Baloh et al., 1998b). Die Persephin-mRNA-Expression konnte wie in unseren Studien zuvor in einer Publikation in humanen Lungen und Tracheen demonstriert werden (Lindahl et al., 2001).

Unsere Untersuchungsergebnisse zur Regulation der GFL-Proteinsynthese hingegen differieren von den Ergebnissen einer Studie, in der nach dreitägiger Allergenprovokation eine vermehrte Expression von GDNF in histologischen Schnitten nachgewiesen werden konnte (Lieu et al., 2012). In den dort gezeigten Versuchen wurden jedoch unbefriedigende Methoden an Geweben von Meerschweinchen angewendet, so dass wir in der vorliegenden Arbeit die GDNF-Immunreaktivität erneut untersucht haben. So wurden in der genannten Studie z.B. nur Gewebe von je 2 Meerschweinchen der OVA-Gruppe und 2 Meerschweinchen, die nicht behandelt wurden, untersucht. Die GDNF-Expression konnte nicht konstitutiv nachgewiesen werden, sondern war lediglich in den Geweben der 2 Tiere, bei denen eine Atemwegsinflammation induziert wurde, im Epithel nachweisbar. Zudem wurden nur

simultane Doppelfärbungen mittels GDNF- und BDNF-Antikörper durchgeführt, wobei beide Primärantikörper aus dem Kaninchen stammten und nicht klar ist, wie die beiden Signale differenziert wurden. Beide Antikörpersignale markierten das Epithel, wobei es bei der oben genannten Antikörperkonstellation durchaus möglich ist, dass in beiden Fällen die gleichen Antigene detektiert wurden (Lieu et al., 2012).
Wie bereits erwähnt, scheint zudem ein Vergleich der Quantifizierung von Signalstärken immunhistochemischer Färbungen aufgrund der großen Schwankungsbreiten sehr kritisch. Die Anzahl von zwei untersuchten Tieren pro Gruppe lässt zusätzlich an der Validität der Ergebnisse zweifeln.
In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation der GFLs per Immunhistochemie in den Atemwegen erneut und mit einer größeren n-Zahl von 4 unbehandelten Mäusen und je 5 Tieren der OVA- und der PBS-Gruppe nachgewiesen. Die Bindung der Primärantikörper an das jeweilige Zielprotein wurde durch Präabsorptionskontrollen überprüft. Das Fehlen einer unspezifischen Bindung der Sekundärantikörper wurde durch PBS-Kontrollen, in denen der Primärantikörper durch PBS ersetzt wurde, kontrolliert. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede im Versuchsaufbau erscheinen unsere Ergebnisse, die keine Regulation der GFL-Expression auf Protein-Ebene nachweisen, deutlich vertrauenswürdiger als die Ergebnisse von Lieu et al., die eine vermehrte Expression von GDNF in histologischen Schnitten zeigen (Lieu et al., 2012). Dies gilt unabhängig davon, dass wir aufgrund des von uns erbrachten Nachweises der signifikanten Regulation der GDNF-mRNA-Expression ebenfalls mit einer Regulation der GDNF-Expression auf Proteinebene gerechnet hätten.

Aufgrund der Gemeinsamkeiten von GFLs und anderen Nervenwachstumsfaktoren, den Neurotrophinen, ist ein Vergleich unserer Ergebnisse zur Regulation der GFLs bei einer allergischen Atemwegsinflammation mit entsprechenden Untersuchungen an Neurotrophinen von Interesse. Die Rezeptoren, an die GFLs und Neurotrophine binden, sowie die von ihnen ausgehenden Signaltransduktion lassen vermuten, dass beide Gruppen von Nervenwachstumsfaktoren zu ähnlichen Wirkungen führen.
Die GFLs binden jeweils an ihre spezifischen Rezeptoren GFRα1-4. Der GFL-GFRα-Komplex bindet dann an die Rezeptor-Tyrosinkinase RET und aktiviert sie (Airaksinen et al., 1999; Baloh et al., 1998b; Jing et al., 1997, 1996; Lindahl et al., 2001; Sariola & Saarma, 2003). Die Neurotrophine binden hingegen an ihren niedrigaffinen Rezeptor p75NTR und an die verschiedenen hochaffinen Trk-Rezeptoren. NGF bindet an TrkA, BDNF an TrkB, NT3 an TrkC. Trk-Rezeptoren gehören wie RET zur großen Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (Freissmuth et al., 2012). Wie durch die Mehrzahl der untersuchten Rezeptortyrosinkinasen werden sowohl durch RET als auch durch die

Trk-Rezeptoren die *rat-sarcoma/mitogen-activated-protein*-(Ras/MAP)-Kinase-, die Phosphoinositid-3-(PI3)-Kinase-, und die Phospholipase C-γ (PLCγ)-Signalkaskade initiiert (Ibáñez, 2013). Neben den Gemeinsamkeiten bezüglich der Rezeptoren und Signalkaskaden fallen auch Parallelen beim Vergleich der Regulation der Nervenwachstumsfaktoren bei einer allergischen Atemwegsinflammation auf.

So konnte in der Vergangenheit bereits für die Neurotrophine genau wie für die GFLs eine Regulation durch eine Atemwegsinflammation auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Nach der Provokation von Patienten mit niedriger Allergendosis stieg beispielsweise die NGF-mRNA-Expression in humanen Bronchialbiopsien von Asthmatikern (Kassel et al., 2001). In einer anderen Studie konnte nach segmentaler Allergenprovokation von Asthmatikern zusätzlich auch der Anstieg von NGF, BDNF und NT3 auf Proteinebene per ELISA in der BALF nachgewiesen werden (Virchow et al., 1998). Diese Publikationen zeigen, genau wie die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Expression der Nervenwachstumsfaktoren im Falle einer allergischen Atemwegsinflammation reguliert wird.

Zudem konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die Neurotrophine einen Einfluss auf die Entwicklung der AHR haben, wie wir ihn in ähnlicher Weise von den GFLs vermuten. So bewirkte die nasale Applikation von NGF oder BDNF, ebenso wie die Überexpression von NGF durch Clarazellen, dass bei der elektrischen Feldstimulation der murinen Atemwege bereits durch deutlich niedrigere Stimulationsfrequenzen als in der Kontrollgruppe eine vergleichbare Kontraktion der Atemwegsmuskulatur erreicht wurde (Braun et al., 2001, 2004). Weitere Versuche zeigten, dass Tiere mit erhöhten NGF-Konzentrationen in der BALF ebenfalls eine Hyperreagibiltät der Atemwege bei der elektrischen Feldstimulation aufwiesen und dass diese durch die Applikation von Antikörpern gegen NGF deutlich reduziert werden konnte (Braun et al., 1999). Bei Tieren mit einer AHR bei Atemwegsinflammation konnte die Hyperreagibilität durch die Behandlung mit einem Antikörper gegen BDNF ebenfalls nachweislich reduziert werden (Braun et al., 2004). Diese Studien zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Nervenwachstumsfaktoren und der Entwicklung von asthmatypischen Symptomen besteht, wie er auch im Falle der GFLs denkbar ist.

Unsere Ergebnisse werden zudem durch Veröffentlichungen zur GFL-Expression bei anderen inflammatorischen Erkrankungen gestützt. Da es sich bei der Colitis ulcerosa wie beim Asthma um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt und die Pathogenese und die Symptome der beiden Erkrankungen Ähnlichkeiten aufweisen, galt unsere Aufmerksamkeit einer Studie zur Colitis. Der Entzündung liegt bei beiden Erkrankungen eine pathologische Immunreaktion gegenüber harmlosen

Umweltantigenen im Falle von Asthma, bzw. gegenüber unbekannten Faktoren, eventuell auch der eigenen Darmflora, im Falle der Colitis zugrunde. Während Patienten mit Colitis ulcerosa vor allem an anfallsartigen krampfhaften Kontraktionen der Darmmuskulatur, den Koliken leiden, äußert sich eine solche Kontraktion der Muskulatur bei Asthmatikern als Bronchokonstriktion durch Atemnot. Aufgrund der aufgeführten Gemeinsamkeiten der Krankheiten ist ein Vergleich der GFL-Regulation durch die beiden Erkrankungen von Interesse. Beispielsweise konnte bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine signifikante Herabregulation von Neurturin in kolorektalen Schleimhautbiopsien festgestellt werden. Die GDNF-mRNA-Expression war bei den Patienten mit Entzündung tendenziell herabreguliert, während die Artemin-Expression tendenziell hochreguliert war (Deberry et al., 2014). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Inflammation im humanen Colon wie in den murinen Atemwegen zur gleichen Tendenz bezüglich der Regulation von GDNF-mRNA und Artemin-mRNA-Expression und zur gleichen signifikanten Veränderung bezüglich der Neurturin-mRNA-Expression führt. In unseren Ergebnissen war die Regulation der Neurturin-mRNA ($p \leq 0{,}01$) und der GDNF-mRNA ($p \leq 0{,}05$) signifikant in den entzündeten Lungen reduziert, während die Artemin-mRNA genau wie bei den Versuchen zur Colitis in der OVA-Gruppe nur eine Tendenz zur Erhöhung zeigte. Andere Untersuchungen zeigten zudem, dass eine mRNA-Regulation, wie sie in unseren Versuchen nachgewiesen wurde, nicht auf die allergischen, TH_2-dominierten Entzündungen reduziert ist, sondern auch bei TH_1-dominierten Entzündungen nachweisbar ist. Bei Meerschweinchen konnte z.B. durch die Injektion von *complete Freunds adjuvant* in die Pfoten eine TH_1-dominierte Inflammation der Haut induziert werden, daraufhin wurde die mRNA-Expression von GDNF, Neurturin und Artemin in der Haut der Pfoten gemessen. Auch bei diesen Versuchen wurden GDNF- und Neurturin-mRNA vermindert und Artemin-mRNA vermehrt exprimiert (Malin et al., 2006).

Da anzunehmen ist, dass die in unseren Versuchen nachgewiesene, signifikante Regulation der mRNA-Expression ggf. im zeitlichen Verlauf zu einer Regulation der Proteinsynthese führen könnte, die in unseren Westernblotversuchen nicht nachgewiesen werden konnte, ist zur weiteren Untersuchung eine Quantifizierung der Protein-Expression mittels ELISA sinnvoll. Bei diesem Verfahren mit einer höheren Sensibilität könnten auch kleinere Unterschiede in der Proteinexpressionsstäke detektiert werden. Ebenfalls sind Untersuchungen zur Proteinsynthese zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Allergenprovokation bzw. der Tiertötung von Interesse, um die Kinetik der Proteinsynthese zu untersuchen. Auch hierzu sind quantifizierbare Untersuchungen denkbar.

4.4 Die Lokalisation der GFLs in den Atemwegen

Nachdem die GFL-mRNA-Expression in den Atemwegen bestätigt werden konnte, war das nächste Ziel herauszufinden, wo bzw. von welchen Zellen die GFLs exprimiert werden. Hierzu wurden zwei Methoden verwendet. Mittels laserassistierter Mikrodissektion wurde die Lokalisation auf mRNA-Ebene untersucht. In den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, durch die die Proteinsynthese nachgewiesen wurde, konnte die Lokalisation immunhistologisch detektiert werden. Aufgrund der begrenzten Probenmengen wurde nur die mRNA-Expression von GDNF als Ligand des GFRα1-Rezeptors und von Artemin als Ligand des GFRα3-Rezeptors in den laserassistiert gewonnen Gewebeproben untersucht. Der Grund für diese Selektion war die Tatsache, dass GFRα1 in 88% der C-Faserneuronen des Ggl. nodosum, aber nur in 60% der C-Faserneurone des Ggl. jugulare exprimiert wird. GFRα3 wird im Gegensatz dazu ausschließlich in C-Faserneuronen des murinen Ggl. jugulare exprimiert (Nassenstein et al., 2010).

Die GDNF-mRNA konnte in allen 6 laserassistiert gewonnenen Proben aus dem Alveolarbereich nachgewiesen werden. Zudem war GDNF in 4 von 6 Proben aus dem Gesamtbronchus, in 2 von 5 Proben aus Trachealmuskulatur und in 3 von 5 Proben aus dem Trachealepithel nachweisbar. Als Protein konnte GDNF mittels Immunhistologie vor allem im Bronchial- und Trachealepithel lokalisiert werden. Dies galt für die unbehandelten Tiere genauso wie für die Tiere der PBS- und der OVA-Gruppe. Die allergische Atemwegsinflammation führte nicht zu einer Veränderung der Lokalisation der GDNF-Expression.

Beim Betrachten der Gesamtheit unserer Versuchsergebnisse zur GDNF-Synthese auf mRNA- und Protein-Ebene sind die unterschiedlichen verwendeten Methoden zu bedenken. Bei der Untersuchung der mRNA-Expression in den laserassistiert gewonnenen Gewebeproben kann nur eine sehr geringe Menge RNA untersucht werden, so dass die Menge der GDNF-mRNA in den 2 Trachealepithelproben, in denen keine mRNA nachgewiesen werden konnte, evtl. unter der Nachweisgrenze lag. Dies könnte erklären, wieso in nur 3 von 5 Proben des laserassistiert gewonnen Trachealepithels GDNF nachweisbar ist, während GDNF bei allen Versuchstieren immunhistochemisch im Epithel detektiert werden konnte.

Die Diskrepanz zwischen der konstanten GDNF-mRNA-Expression in den Alveolen bei entsprechend fehlender Immundetektion in den Alveolen könnte durch eine Synthese des GDNFs in den Alveolen mit anschließender Sekretion und einem Transport zum Atemwegsepithel, das ebenfalls GDNF synthetisiert, erklärt werden (Lonka-Nevalaita et al., 2010; Piccinini, 2014). Dies würde zu einer Konzentrierung des GDNFs im Atemwegsepithel führen. Da dort auch die Nervenendigungen der sensiblen C-

Faserneurone lokalisiert sind (Watanabe et al., 2005), ist so ein direkter Einfluss auf die Neurone und die TRP-Kanäle denkbar. Zur Weiterführung des Projektes ist daher die Untersuchung der GFLs in den BALF-Überständen von Interesse. Damit könnte der Frage nachgegangen werden, in welchem Maße die GFLs sekretiert werden. Ebenfalls ist es möglich, dass aufgrund der unterschiedlichen Sensitivitäten der Untersuchungsmethoden die mRNA-Expression in den Alveolen, bei entsprechend ausreichender RNA-Menge, nachweisbar ist, die Sensitivität der Immundetektion bei einer möglicherweise geringen Protein-Menge in den Alveolen aber nicht ausreichend ist, um GDNF zu detektieren.

Unsere Ergebnisse werden durch eine Studie unterstützt, die die Immundetektion von GDNF im Atemwegsepithel beschreibt (Lieu et al., 2012). Bei dieser Studie handelt es sich jedoch um den bereits in 4.3 kritisch bewerteten Versuchsaufbau. Aufgrund der diskutierten Punkte, wie der zweifelhaften Antikörperkonstellation bei Färbungen mit zwei Antikörpern, der geringen n-Zahl usw., wurde die Validität der Untersuchung angezweifelt, so dass wir die Lokalisation der GFLs in den Atemwegen erneut immunhistologisch an einer deutlich größeren n-Zahl untersucht haben.

In in-situ-Hybridisierungen konnte die GDNF-mRNA beispielsweise im Epithel der Nasenhöhle von Rattenembryonen nachgewiesen werden. Außerdem konnte sie in der zirkulären und der longitudinalen Schicht der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes inklusive dem Ösophagus und in geringerer Stärke auch in der Submukosa nachgewiesen werden (Nosrat et al., 1996). Beim Vergleich der untersuchten GDNF-mRNA-Expression in diesen peripheren Geweben mit unseren Daten fällt auf, dass ähnlich wie bei der in-situ-Hybridisierung im Gastrointestinaltrakt (Nosrat et al., 1996) auch bei den RT-PCRs in unseren Versuchen mit laserassistiert gewonnenen Proben aus den Atemwegen, das Epithel und die glatte Muskulatur jeweils die Quelle der GDNF-mRNA sind.

Neurturin wurde wie GDNF in unseren Versuchen im Trachealepithel und zusätzlich in der glatten Muskulatur der Atemwege sowie in der Basalmembran immunhistologisch detektiert. Bei immunhistochemischen Untersuchungen peripherer Geweben adulter Ratten wurde Neurturin im Nebennieren- und Nierenkortex und in deutlich stärkerer Ausprägung im Mark der Nebenniere und Niere detektiert. In den Speicheldrüsen wurde Neurturin vor allem in den serösen Azini, im Gastrointestinaltrakt vor allem im Epithel der Krypten, im Epithel der Villi intestinales und in der Muskelschicht detektiert. Ebenso konnte es in den Spermatozyten und Spermatiden der Hoden und in den Follikeln der Ovarien sowie in der weißen Pulpa der Milz gefunden werden (Xian et al., 1999). Da die Atemwege in dieser Studie nicht untersucht wurden, ist ein direkter Vergleich mit unseren Daten nicht möglich. Bei Betrachtung der von uns erhobenen

Daten zur GFL-Expression in den Atemwegen in Zusammenschau mit den Ergebnissen zur Neurturin-Expression im Gastrointestinaltrakt (Xian et al., 1999) fällt jedoch auf, dass Neurturin wie GDNF in der glatten Muskulatur und zudem im Epithel des Gastrointestinal- und Respirationstrakts nachgewiesen werden konnte.
Im Falle von Artemin wurde die Proteinexpression in unseren Versuchen vor allem in Bronchial- und Trachealepithel detektiert. Die mRNA-Expression konnte ebenfalls in unterschiedlicher Häufigkeit in allen 4 untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Am häufigsten wurde Artemin in unseren Untersuchungen in Bronchien, Trachealepithel und -muskulatur detektiert. Eine geringere Sensitivität der immunhistologischen Untersuchungen, wie sie im Falle von GDNF bereits diskutiert wurde, könnte auch der Grund für die mangelnde Artemin-Markierung in der glatten Muskulatur der Atemwege sein, obwohl die mRNA-Expression bei 5 von 5 Tieren in der Trachealmuskulatur nachgewiesen wurde.
Bisher existieren nur wenige Untersuchungen zur Artemin-Expression in peripheren Organen. In diesen Untersuchungen wurden jedoch nur ganze Organe und keine einzelnen Gewebe auf ihre Artemin-Expression untersucht, so dass an dieser Stelle kein Vergleich zur Literatur gezogen werden kann (Baloh et al., 1998b). Gleiches gilt für Persephin (Lindahl et al., 2000), das in unseren Versuchen durch den Antikörper am stärksten in der glatten Muskulatur der Atemwege markiert wurde.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der GFLs in den Atemwegen mit den Expressionsmustern anderer Nervenwachstumsfaktoren, die aufgrund der Gemeinsamkeiten ihrer Rezeptoren und der durch sie aktivierten Signalkaskaden möglicherweise zu ähnlichen Wirkungen führen (siehe auch 4.3.), können Überschneidungen gefunden werden. So konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass NGF wie auch die GFLs hauptsächlich in den Epithelzellen der Atemwege exprimiert wird. Weniger stark wurde NGF in Blutgefäßen, Fibroblasten und in einigen infiltrierenden Zellen vom Antikörper detektiert (Kassel et al., 2001). Die BDNF-mRNA war ebenfalls sehr stark im Atemwegsepithel und etwas weniger stark in der glatten Muskulatur exprimiert (Lommatzsch et al., 1999).
Die Expression der Rezeptoren für NGF und BDNF, TrkA und TrkB, konnte, genau wie die Expression der GFL-Rezeptoren GFRα1-4 (siehe 4.2), mittels RT-PCR in lungeninnervierenden C-Faserneuronen des Ggl. jugulare/nodosum detektiert werden. Dabei exprimierten im Ggl. jugulare 6 von 15 C-Faserneuronen TrkA und 5 von 15 C-Faserneuronen TrkB. Im Ggl. nodosum wurden insgesamt deutlich mehr lungeninnervierende C-Faserneurone untersucht. In 87% dieser Neurone wurde die

Expression von TrkB und in 20,7% die Expression von TrkA nachgewiesen (Nassenstein et al., 2010).

Dies zeigt, dass eine Co-Expression der GFL-Rezeptoren und der Neurotrophin-Rezeptoren auf lungeninnervierenden Neuronen des Ggl. jugulare/nodosum stattfindet. Immunhistochemische Untersuchungen konnten zudem verifizieren, dass TrkA, TrkB und TrkC auch in Nervenfasern sowie in subepithelialen Varikositäten, die am ehesten sensiblen Nervenfasern entsprechen, in der Lunge detektiert werden können (Nassenstein et al., 2006). In derselben Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Tiere, die mit OVA sensibilisiert und provoziert wurden, mit einer Bronchokonstriktion auf die inhalative Provokation mit Capsaicin, als einem selektivem Stimulanz der C-Faserneurone, reagierten. Die Bronchokonstriktion konnte in diesem Falle durch die Applikation von REN1826, einem löslichen Trk-Rezeptor-Fragment, das Neurotrophine bindet, signifikant reduziert werden. Die ebenfalls auftretende Bronchokonstriktion nach der Stimulation mit Methacholin, einem Muskarinrezeptor-Agonisten, wurde hingegen nicht durch REN1826 beeinflusst. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Neurotrophine einen Einfluss auf Asthmasymptome wie Hyperreagibilität und Bronchokonstriktion haben, der durch die sensiblen C-Faserneurone vermittelt wird.

Die Tatsache, dass die Expression der GFLs und der Neurotrophine bzw. ihrer Rezeptoren jeweils in den gleichen Geweben lokalisiert ist, unterstützt unsere Hypothese, dass die GFLs wie die Neurotrophine durch die Beeinflussung der sensiblen vagalen C-Faserneurone in der Lunge einen Einfluss auf die genannten asthmatypischen Symptome haben.

Zur Weiterführung der Untersuchung der mRNA-Expression in einzelnen Geweben wären quantitative PCR Untersuchungen der laserassistiert dissektierten Geweben interessant, da dadurch die Stärke der Expression in den verschiedenen Gewebstypen verglichen werden könnte. Darüber hinaus wären Versuche von Interesse, die eine Charakterisierung der Zellen, die die GFLs im Epithel synthetisieren, ermöglichen. Dies kann durch single-cell-RT-PCRs erfolgen, die Pneumozyten Typ 1 und 2, Becherzellen, Keulenzellen, Kinozilien-tragende Zellen, Bürstenzellen und neuroendokrine Zellen getrennt auf ihre mRNA-Expression untersuchen.

4.5 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf die funktionellen Eigenschaften der C-Faserneurone des Ggl. jugulare/nodosum

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob GDNF und Artemin in der Lage sind, die funktionellen Eigenschaften der Neurone des Ggl. jugulare/nodosum zu verändern und so zur Entstehung der AHR beitragen könnten. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte getestet werden, ob es durch den Einfluss der GFLs zu einer veränderten Reaktion der C-Faserneurone auf die Stimulation mit Liganden der TRP-Rezeptoren im Sinne der neuronalen Plastizität der Neurone kommt. Dabei wurde untersucht, ob sich der prozentuale Anteil der CPS- und ZA-reaktiven Neurone an der Gesamtzahl aller Neurone und der Anzahl der Neuronen bestimmter Subpopulationen durch die Inkubation mit GDNF und Artemin verändert. Zum anderen wurde untersucht, wie sich die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von CPS durch die Inkubation der Neurone mit GDNF und Artemin verändert.

4.5.1 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf die prozentualen Anteile der Capsaicin- und Zimtaldehyd-reaktiven Neurone

Die Inkubation der Neurone mit GDNF führte zu einem signifikant erniedrigten Anteil der CPS-reaktiven Neurone an der Gesamtzellzahl. Zudem führte sie zu einem tendenziell niedrigeren Anteil der ZA-reaktiven Neurone der C-Faserneurone des Ggl. nodosum. Der Effekt dieser Beeinflussung der Neurone auf die AHR wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, die gezeigten Ergebnisse könnten jedoch auf einen AHR-reduzierenden Effekt von GDNF hinweisen.

Eine Publikation zur Regulation der TRPV1-Expression zeigt konträre Ergebnisse zu unseren Daten. So wurde in der beschriebenen Publikation bei Meerschweinchen eine Steigerung der TRPV1-mRNA-Expression und damit indirekt ihrer CPS-Reaktivität in tracheainnervierenden Neurone des Ggl. nodosum durch eine Atemwegsinflammation sowie durch die Instillation von GDNF in die Trachea nachgewiesen (Lieu et al., 2012).

In der Publikation selbst wird diskutiert, dass der Grund zur Vergrößerung des Anteils TRPV1-exprimierender Neurone eine neuroplastische phänotypische Veränderung der Aδ-Neurone sein könnte, die im Falle der Entzündung eine TRPV1-Synthese beginnen (Lieu et al., 2012), die sonst recht spezifisch für die C-Faserneurone ist (Kobayashi et al., 2005; Michael & Priestley, 1999).

Ein Unterschied im experimentellen Aufbau dieses Versuches und unserer Versuche, der möglicherweise einen Erklärungsansatz für die Unterschiede der Daten bietet, liegt in den untersuchten Spezies und Geweben. Im beschriebenen Versuch wurden

spezifisch vagale tracheainnervierende Neurone von Meerschweinchen untersucht, während wir alle Neurone des Ggl. jugulare/nodosum von Mäusen untersuchten. Zudem wurden unsere Versuche ausschließlich an präparierten Neuronen *in vitro* durchgeführt, während in der Studie GDNF-Injektionen *in vivo* durchgeführt wurden, so dass die Unterschiede sowohl speziesbedingt als auch durch die unterschiedlichen Wirkungen bei einer Stimulation *in vitro* im Gegensatz zur Stimulation *in vivo* erklärt werden könnten.

Da es in unseren Versuchen nicht zu einer signifikanten Steigerung des prozentualen Anteils der CPS-reaktiven Neurone der OVA-Gruppe gegenüber der PBS-Gruppe kam, gehen wir davon aus, dass es nicht zu einer Induktion der TRPV1-Synthese in anderen Zellpopulationen als den C-Faserneuronen gekommen ist. Mit absoluter Sicherheit ist bei unseren Ergebnissen jedoch nicht auszuschließen, dass es beispielsweise zu einer Verringerung der Anzahl $TRPV1^+$ C-Faserneurone und einer gleichzeitigen *de novo* Expression von TRPV1 in z.B. Aδ-Faserneuronen gekommen ist und dadurch keine Veränderung des Anteils der TRPV1-exprimierenden Neurone in beiden Versuchsgruppen beobachtbar ist.

Um die Frage, ob eine phänotypische Veränderung der Aδ-Faserneurone eine mögliche Erklärung zur Regulation der TRPV1-Synthese bzw. der CPS-Reaktivität ist, genauer zu klären, müssen weitere Versuche durchgeführt werden. Dazu könnten Untersuchungen von Interesse sein, bei denen die Neurone nicht ausschließlich nach ihrer Reaktivität auf verschiedene Agonisten, sondern auch nach den Leitungsgeschwindigkeiten der Neuronen differenziert werden. Dazu wären beispielsweise Untersuchungen mittels *extracellular recording* denkbar, bei denen die C-Faserneurone und Aδ-Faserneuronen differenziert und ihre Reaktion auf eine Stimulation mit Capsaicin gemessen werden könnte.

Die Inkubation der Neurone mit Artemin führte in unseren Versuchen nicht zu einer Veränderung des Anteils der CPS-reaktiven Neurone des Ggl. jugulare. Der Anteil der ZA-reaktiven Neurone der C-Faserneurone des Ggl. jugulare war durch die Inkubation mit Artemin signifikant erhöht. Auch im Falle der Artemin-Inkubation wurde der Einfluss auf die AHR nicht untersucht. Die gezeigten Ergebnisse könnten aber auf einen AHR-steigernden Effekt von Artemin hinweisen. Da die C-Faserneurone als differenzierte Zellen nicht mehr teilungsfähig sind, war auch keine Erhöhung des Anteils der CPS-reaktiven Neurone durch die Inkubation mit Artemin zu erwarten. Diese Ergebnisse stützen folglich die Verwendbarkeit der oben diskutierten Auswertungsmethodik der Calciumimaging-Versuche, die alle $TRPV1^+$-/CPS-reaktiven-Neurone als Subpopulation der C-Faserneurone definiert. Die untersuchte Steigerung des Anteils

ZA-reaktiver Neurone kann durch eine TRPA1-Freisetzung aus Vesikeln auf die Zelloberfläche der Neurone oder eine Induktion der TRPA1-Expression in Neuronen, die zuvor kein TRPA1 exprimierten, erklärt werden.

In einem anderen Versuchsaufbau, bei dem genetisch modifizierte Tiere Artemin in der Haut überexprimieren, wurde die Änderung der Neuronenzahlen im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Elitt et al., 2006). Bei den untersuchten Tieren kam es aufgrund der Artemin-Überexpression zu einem Anstieg der Gesamtneuronenzahl in DRGs um 20,5% gegenüber den Wildtyp-Tieren und einem Anstieg der mRNA-Expression von GFRα3, TrkA, TRPA1 sowie TRPV1 gegenüber den Wildtyp-Tieren. Diese Versuche konnte jedoch zeigen, dass der prozentuale Anteil der TRPV1-exprimierenden Neurone sich durch die Artemin-Überexpression nicht verändert hatte, so dass die erhöhte TRPV1-mRNA Expression durch die erhöhte Gesamtzellzahl erklärt wird (Elitt et al., 2006).

Ein entscheidender Unterschied zwischen der beschriebenen Publikation und unseren Versuchen ist die Art und Weise, wie bzw. wann Artemin auf die Neurone einwirkt. In der Publikation wurde eine genetisch veränderte Maus genutzt, so dass die Artemin-Stimulation der Zellen *in vivo* bereits seit der embryonalen Entwicklung bestand und so möglicherweise einen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen hatte. In unserem Modell fand die Artemin-Inkubation isolierter Neurone *in vitro* statt, deren Differenzierung bereits abgeschlossen ist. Eine Veränderung der Gesamtzellzahl ist in unseren Versuchen folglich nicht möglich. Dieser Versuch zeigt also einen Ausblick auf die Einflussmöglichkeiten einer Artemin-Stimulation *in vivo*, die durch unsere Versuche nicht dargestellt werden können. Dieser Unterschied im Versuchsaufbau könnte auch erklären, dass in den durchgeführten intrazellulären Calciummessungen durch eine Stimulation mit CPS bei den Artemin überexprimierenden Tieren, die höhere Mengen TRPV1-mRNA aufwiesen, prozentual mehr Zellen auf einen Reiz mit CPS reagieren als Neurone der entsprechenden Wildtypen (Elitt et al., 2006). Auch der Einfluss von Artemin auf die Expression von TRPA1-Rezeptoren wurde untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die TRPA1-mRNA Expression in DRGs in Artemin-überexprimierenden Neuronen um 210% gesteigert wird (Elitt et al., 2006). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Resultate, die zeigen, dass die Inkubation der C-Faserneurone mit Artemin zu einem gesteigerten Anteil der ZA-reaktiven C-Faserneurone führt. Dies demonstriert, dass es für die Regulation der TRPA1-Expression anscheinend keine Rolle spielt, wann Artemin auf die Neurone einwirkt bzw. ob die Stimulation nur *in vitro* oder *in vivo* stattfindet.

4.5.2 Der Einfluss von GDNF und Artemin auf den Capsaicin-induzierten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration

Der Einfluss von GDNF und Artemin auf das CPS-abhängige $\Delta[Ca^{2+}]_i$ in Neuronen des Ggl. jugulare/nodosum wurde untersucht und damit indirekt auch ihr Einfluss auf eine mögliche AHR analysiert.

Die Inkubation der C-Faserneurone des Ggl. nodosum für 24 h mit GDNF bewirkte ein signifikant verringertes $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nach der Stimulation mit ansteigenden CPS-Konzentrationen. Nach vierstündiger GDNF-Inkubation war nur bei der Stimulation mit der mittleren CPS-Konzentration von 30 nM ein erhöhter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nachweisbar. Da dieser Anstieg nicht konsistent in den ansteigenden CPS-Konzentrationen nachweisbar war und die verringerten intrazellulären Calciumkonzentrationen nach 24 h GDNF-Inkubation konstant in allen 3 CPS-Konzentrationen reproduzierbar waren, halten wir den vereinzelten Anstieg nicht für relevant.

Die Inkubation der C-Faserneurone des Ggl. jugulare mit Artemin sowie mit NGF als Positivkontrolle bewirkte einen Anstieg des CPS-abhängigen $\Delta[Ca^{2+}]_i$ gegenüber dem entsprechenden $\Delta[Ca^{2+}]_i$ bei Inkubation mit Kontrollmedium. Dieser Anstieg war statistisch signifikant bei der Stimulation mit 30 nM und 300 nM CPS nach vierstündiger Artemin-Inkubation und bei der Stimulation mit 300 nM nach 24-stündiger Artemin-Inkubation.

Im Bezug auf die Wirkung der Artemin-Inkubation werden unsere Daten durch Versuche gestützt, die zeigen, dass eine 7-minütige Exposition mit Artemin und NGF den CPS-abhängigen Calciumanstieg in DRG Neuronen erhöht (Malin et al., 2006). Bei diesen Versuchen wurden jedoch auch bei der Exposition mit GDNF und Neurturin die gleichen Ergebnisse gewonnen wie bei Artemin und NGF. So steigerte NGF den Calciumanstieg bei 68%, Artemin bei 66%, Neurturin bei 29% und GDNF bei 39% der CPS^+-Neurone (Malin et al., 2006). Bei Betrachtung der GDNF-Wirkung scheinen sich unsere Daten und die Ergebnisse von Malin et al. zu widersprechen. Ein Unterschied in den Versuchsaufbauten, der dafür verantwortlich sein könnte, ist die Auswahl der untersuchten Neuronenpopulationen. Malin et al. untersuchten Neurone aus den DRGs, die wie die Neurone des Ggl. jugulare aus der Neuralleiste entstammen und ihnen daher phänotypisch ähneln (Nassenstein et al., 2010). In unserer Arbeit hingegen wurde der Einfluss der GDNF-Inkubation ausschließlich auf die Neurone des Ggl. nodosum untersucht, während der Einfluss von Artemin nur an Neuronen des Ggl. jugulare untersucht wurde. Da sowohl im Ggl. nodosum als auch in den $TRPV1^+$-Neuronen der DRGs GFRα1 exprimiert wird (Nassenstein et al., 2010), ist bei beiden Neuronenpopulationen mit einer Wirkung der GDNF-Inkubation zu rechnen. An dieser

Stelle kommt aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse die Frage auf, ob Neurone des Ggl. nodosum grundsätzlich anders auf die Inkubation mit GFLs reagieren als Neurone des Ggl. jugulare bzw. die ebenfalls aus der Neuralleiste stammenden DRGs.
Zur weiteren Klärung der aufgeworfenen Frage könnten Calciummessungen an Neuronen aus der Neuralleiste und Neuronen aus den Plakoden, die jeweils mit GFLs inkubiert wurden, direkt miteinander verglichen werden. Dazu müssten die Neurone durch einen Marker, wie z.B. P2X2, in Zellen der Neuralleiste und Zellen der Plakoden unterschieden und einzeln isoliert werden. Alternativ wäre zur Differenzierung der Zellen auch die Nutzung einer Wnt1Cre/R26R-Maus denkbar, bei der alle Zellen, die von der Neuralleiste abstammen, β-Galaktosidase exprimieren, so dass sie durch eine Farbreaktion bei der enzymatischen Spaltung eines speziellen Substrates sichtbar gemacht werden können (Nassenstein et al., 2010; Jiang et al., 2000).

Bei unseren Untersuchungen zur CPS-abhängigen Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Inkubation mit vergleichbaren Konzentrationen von Artemin und NGF als Positivkontrolle zeigte sich, dass die Artemininkubation häufig, nämlich nach 4 h Inkubation bei Stimulation mit 30 nM und 300 nM CPS und nach 24 h Inkubation bei Stimulation mit 300 nM CPS, höhere Anstiege des intrazellulären Calciums bewirkte als die Positivkontrolle NGF.
Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Artemin einen stärkeren Effekt als NGF auf die Reaktivität der C-Faserneurone des Ggl. jugulare hat, und unterstreichen so die Wirkungsstärke der GFLs. Diese Tatsache macht es als möglichen Angriffspunkt beispielsweise für antiasthmatische Therapien sehr interessant.
Die gezeigten Ergebnisse können zudem durch eine Publikation gestützt werden, bei der sich ebenfalls die GFLs als die effektiveren Modulatoren des CPS-abhängigen $\Delta[Ca^{2+}]_i$ in DRGs als NGF darstellten. Die Inkubation mit NGF zeigte in diesen Versuchen erst ab einer Konzentration von 100 ng/ml eine Wirkung im Sinne einer Steigerung des CPS-Effektes, während bei einer Konzentration von 1 ng/ml keine veränderte Reaktivität der Neurone zu verzeichnen war (Malin et al., 2006). Die Inkubation mit GDNF, Neurturin und Artemin hingegen zeigte bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml eine Wirkung im Sinne einer gesteigerten CPS-Reaktivität (Malin et al., 2006). Diese Studie demonstriert zudem, dass das Potenzial zur Beeinflussung der Reaktivität der C-Faserneurone nicht allein auf Artemin beschränkt ist, sondern für die meisten GFLs nachweisbar ist.
Da die Signaltransduktion aller GFLs durch die Rezeptortyrosinkinase RET ausgelöst wird, an die zuvor ein spezifischer GFL-GFRα-Komplex gebunden wird, ist mit

ähnlichen Wirkungen der GFLs zu rechnen (Airaksinen et al., 1999; Baloh et al., 1998b; Jing et al., 1997, 1996; Lindahl et al., 2001; Sariola & Saarma, 2003). Wie es dazu kommt, dass Artemin und GDNF in unseren Versuchen völlig unterschiedlich auf das $\Delta[Ca^{2+}]_i$ wirken, ist bis dato nicht geklärt. Zu beachten ist jedoch – wie oben erwähnt – dass die Wirkungen in unseren Versuchen auf zwei verschiedene Neuronensubpopulation, aus der Neuralleiste bzw. aus den Plakoden, untersucht wurden. Denkbar wäre beispielsweise, dass verschiedene Neurone die alternativen GFL-Rezeptoren wie NCAM, Syndecan 3 oder noch unbekannte weitere Rezeptoren in verschiedenem Maße exprimieren und es somit zu einer unterschiedlichen Modulation der GFL-Wirkung kommt. Aktuell kann darüber jedoch nur spekuliert werden.
Interessant ist die Zusammenschau der Ergebnisse der quantitativen PCR und der Calciummessungen. Die Artemin-mRNA wird bei den Tieren der OVA-Gruppe tendenziell verstärkt exprimiert und Artemin bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach CPS-Stimulation sowie einen erhöhten Anteil ZA^+-C-Faserneurone. Die GDNF-mRNA wird hingegen in der OVA-Gruppe in niedrigerer Menge exprimiert als in der PBS-Gruppe und GDNF bewirkt zudem eine signifikant verringertes $\Delta[Ca^{2+}]_i$, sowie einen erniedrigten Anteil der CPS-reaktiven Neurone an der Gesamtzellzahl und einen tendenziell niedrigeren Anteil der ZA^+-C-Faserneurone. Diese Tatsache bringt eine neue Hypothese auf: Möglicherweise wirkt GDNF beim Asthma bronchiale AHR-hemmend. Durch die Herunterregulation der GDNF-Expression kommt es dann zu einem niedrigeren GDNF-Spiegel und damit zu einem AHR-förderlichen Milieu. Artemin hingegen wirkt durch den Anstieg des $\Delta[Ca^{2+}]_i$ nach CPS-Stimulation AHR fördernd und dieser Effekt kann durch die tendenziell verstärkte Expression noch gesteigert werden. Beide GFLs könnten also völlig gegensätzlich wirken und trotzdem im Falle des Mausmodells der Atemwegsinflammation zum gleichen Ergebnis – der AHR – führen.

Zur Grundsätzlichen weiteren Untersuchung des Einflusses der GFLs auf die C-Faserneurone und die TRP-Rezeptoren und ihren Beitrag zur AHR im allergischen Asthma wären *in vivo* Versuche zur direkten Analyse der AHR, beispielsweise per Bodyplethysmographie bei genetisch veränderten Mäusen, die Artemin in den Atemwegen und/oder den Neuronen überexprimieren und GDNF-knockout Mäusen, von großem Interesse.

4.6 Schlussfolgerung

Die gezeigten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die untersuchte Hypothese, dass die GFL-Synthese in den Atemwegen bei allergischer Atemwegsinflammation verändert ist. Es konnte zudem die Vermutung bestätigt werden, dass GDNF und Artemin in der Lage sind, die funktionellen Eigenschaften der C-Faserneurone bzw. der auf ihnen exprimierten TRP-Kanäle zu verändern. Dies gibt Hinweise darauf, dass sie potentiell zu einer veränderten Reaktivität der TRP-Rezeptoren auf Umweltirritantien und somit zu einer Modulation der AHR beitragen könnten. Ebenfalls scheint die Hypothese, dass die GFLs über die Beeinflussung der C-Faserneurone auch zu einer Beeinflussung der zentralen und peripheren Reflexe wie z.B. Husten und Bronchokonstriktion beitragen, durch die Ergebnisse dieser Arbeit wahrscheinlich.

Ob diese Vermutungen bestätigt werden können, müssen weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels Bodyplethysmographie an lebenden Mäusen, zeigen.

Durch die Untersuchungen und ihren Vergleich mit bereits publizierten Studien sind neue Aspekte vor allem im Bezug auf die Regulation der GFLs und ihrer Wirkung auf die Neurone entdeckt und neue Fragestellungen aufgeworfen worden. Die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese konnte gestützt werden, so dass diese Untersuchungen eine wichtige Rolle der GFLs für die AHR bei allergischer Atemwegsinflammation noch wahrscheinlicher, und ihre weitere Erforschung noch interessanter machen.

5 Zusammenfassung

Viele Umweltirritantien, die TRP-Rezeptoren aktivieren, wie Ozon, kalte und warme Luft und Zigarettenrauch, können, genauso wie die Aktivierung der TRPV1-exprimierenden C-Faserneuronen, Asthmaanfälle auslösen. Daher wurde spekuliert, dass eine veränderte Funktion der TRP-Kanäle die Reizbarkeit dieser sensiblen Neurone beeinflusst. Die meisten Perikarya bronchopulmonaler C-Faserneurone sind in den beiden vagalen sensiblen Ganglien lokalisiert und coexprimieren TRPV1 und den GDNF-Rezeptor GFRα1. Die Rezeptoren für Neurturin, Artemin und Persephin, GFRα2-4, werden ebenfalls im Ggl. jugulare/nodosum exprimiert. Wir vermuteten daher, dass eine veränderte Funktion und/oder Expression der GFLs bei einer allergischen Atemwegsentzündung zu einer Beeinflussung der bronchopulmonalen C-Faserneurone und der auf ihnen exprimierten TRP-Rezeptoren führt, mit der Folge einer verstärkten Atemwegshyperreagibilität. PCR-Versuche, die zur Untersuchung der Hypothese durchgeführt wurden, zeigten eine konstitutive Expression aller 4 GFLs in Lungen und Tracheen der Maus. Zudem konnte in RT-PCRs von Proben, die durch die laserassistierte Mikrodissektion gewonnen wurden, Artemin-mRNA vor allem in Trachealmuskulatur und –epithel sowie im Gesamtbronchus und GDNF-mRNA vornehmlich in den Alveolen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurden die GFLs vor allem in den Atemwegsepithelien detektiert. Um zu untersuchen, ob die GFL-Expression bei einer allergischen Atemwegsentzündung verändert ist, verwendeten wir ein murines Modell der allergischen Atemwegsentzündung. Quantitative RT-PCR-Versuche zeigten eine Herabregulation der GDNF- und Neurturin-mRNA-Expression und eine Tendenz zur Hochregulation der Artemin-mRNA-Expression in den Atemwegen von Mäusen mit allergischer Atemwegsinflammation. Westernblotversuche bestätigten die Proteinsynthese von Artemin und GDNF in den Atemwegen, detektierten jedoch keinen Unterschied zwischen den Protein-Konzentrationen der Lungen mit und ohne Atemwegsinflammation. Zur Untersuchung der funktionellen Konsequenzen einer veränderten GFL-Expression wurden Calcium-Imaging-Versuche durchgeführt. Diese Experimente zeigten, dass die Inkubation von Neuronen des Ggl. nodosum mit GDNF zu einer signifikanten Reduktion des Anteils Capsaicin-reaktiver Neurone führte, während die Inkubation von Neuronen des Ggl. jugulare mit Artemin zu einem erhöhten Anteil TRPA1-exprimierenden C-Faserneurone führte. Die Amplitude des Calciumanstiegs nach einer Capsaicingabe wurde zudem durch GDNF reduziert, während Artemin sie erhöhte. Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die erhöhte Sensibilität der bronchopulmonalen C-Faserneurone, die möglicherweise zu einer gesteigerten Atemwegshyperreagibilität beiträgt, durch die fehlende GDNF-abhängige Inhibition und eine verstärkte Artemin-abhängige Förderung der Aktivität von TRPV1-Kanälen begründet werden könnte.

6 Summary

Many environmental irritants, that can activate TRP-channel family members, including ozone, hot and cold air and cigarette smoke, can lead to asthma attacks. These attacks can also be caused by the activation of TRPV1-expressing C-fibres.

Therefore, it has been speculated, that an altered function of TRP-channels affects the enhanced excitability of these sensory neurons. The majority of the perikarya from bronchopulmonary C-fibers are located in the vagal sensory ganglia and co-expresses TRPV1 and GFRα1, the receptor for GDNF. The receptors for neurturin, artemin and persephin, GFRα2-4, are also expressed on the jugular-nodose ganglion. We, therefore, hypothesized, that an altered function and/or expression of the GFLs in mice with an allergic airway inflammation, contributes to an alteration of bronchopulmonary C-fibers and the TRP-receptors they express, leading to the consequence of an increased airway hyperresponsiveness.

PCR-experiments, that were performed to test this hypothesis, demonstrated that all 4 GFLs are constitutively expressed in lung and trachea of mice. RT-PCR analysis in samples collected by laser-assisted microdissection showed artemin-mRNA primarily in airway smooth muscle and -epithelium as well as in bronchi, and GDNF-mRNA mainly in alveoli. Immunohistochemistry detected the GFLs mainly in airway epithelium. To investigate, if the GFL-expression is altered by an allergic airway inflammation, we used a murine model of allergic airway inflammation.

Quantitative RT-PCR-results showed a decreased GDNF- and neurturin-mRNA-expression and a tendency for an increased artemin-mRNA-expression in airways of mice suffering from airway inflammation. Western blots confirmed the synthesis of artemin and GDNF in the airways, but the semiquantitative analysis did not detect a difference in the protein concentrations of healthy lungs and lungs with airway inflammation.

To explore the functional consequences of an altered GFL-expression, calcium imaging experiments were performed. These experiments showed, that the incubation of neurons from the nodose ganglion with GDNF caused a significant decrease in the percentage of capsaicin-responsive neurons, while an incubation of neurons from the jugular ganglion with artemin caused a significant increase in the percentage of TRPA1-expressing neurons. The amplitude of the rise in intracellular calcium induced by capsaicin was reduced by GDNF while artemin increased it. In conclusion, our data show that the enhanced excitability of bronchopulmonary C-fibres that may contribute to an increased airway hyperresponsiveness might be linked to a loss of GDNF-dependent inhibition and an increase in artemin-dependent promotion of TRPV1-activity.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
Alv	Alveole
APS	Ammoniumpersulfat
ARTN	Artemin
AS	Antisense-Primer
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveloäre Lavage Flüssigkeit
BDNF	*brain derived neurotrophic factor*
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD_4	*cluster of differentiation 4*
cDNA	*complementary* DNA
CGRP	*Calcitonin Gene-Related Peptide*
CNTF	*ciliary neurotrophic factor family*
CPS	Capsaicin
Ct	*cycle threshold*
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	*dorsal root ganglia*
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	*ethylene diamine tetraacetic acid*

EF_{50}	expiratorischer Flow bei 50 % des Ausatemvolumens
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
FBS	*fetal bovine serum*
gDNA	genomische DNA
GDNF	*glial cell line derived neurotrophic factor*
GFL	*glial cell line derived neurotrophic factor family of ligands*
GFRα1-4	*GDNF family receptor α*
Ggl.	Ganglion
Ggll.	Ganglia
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GZZ	Gesamtzellzahl
HBSS	*Hanks' balanced salt solution*
HLA	humanes Leukozytenantigen
HRP	*horseradish peroxidase*
Ig	Immunglobuline
IgE	Immunglobuline der Klasse E
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LAR	*late allergic response*/Spätphasereaktion
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein-kinase
MHC	*major histocompatibility complex*
mRNA	*messenger* RNA
MW	Mittelwert
N.	Nervus

Nn.	Nervi
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
NCAM	*neural cell adhesion molecule*
NGF	*nerve growth factor*
NO	Stickoxid
n.s.	nicht significant
NT3	Neurotrophin 3
OCT	*Optimum cutting temperature compound*
OVA	Ovalbumin
PBS	*phosphat-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	*protein gene product* 9.5
PIP_2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase-C
PLCγ	Phospholipase Cγ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Phosphatpuffer
PSPN	Persephin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RARs	*rapidly adapting strech receptors*
RET	*rearranged during transfection*
RNA	*Ribonucleic Acid*
RNase	Ribonuklease
rpm	*rounds per minute*
RT	Reverse Transkriptase

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Sense-Primer
SARs	*slowly adapting strech receptors*
SCG	Ggl. cervicale superior
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	*tris buffered solution*
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TGFβ	transforming growth factor β
TH_2	T-Helferzelle vom Typ 2
TNFα	*tumor necrosis factor alpha*
TRIS	*Tris(*hydroxymethyl)-aminomethan
TrkA/TrkB/TrkC	*tropomyosin related kinase A/B/C*
TRP	*transient receptor potential cation channel*
TRPA1	*TRP-ankyrin 1*
TRPC	*TRP-canonical*
TRPM	*TRP metastatin*
TRPML	*TRP-mucolipidin*
TRPNOMC	*TRP-no mechanoreceptor potential*
TRPV1	*TRP-vanilloid*
TTBS	*tween tris buffered saline*
UV	Ultraviolett
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
WB	Westernblot
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZA	Zimtaldehyd
χ^2-Test	Chi-Quadrat-Vierfeldertest

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Bindung der GFLs an ihre Rezeptoren, angelehnt an (Airaksinen & Saarma, 2002)..... 15

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese. 18

Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von Zellen nach May-Grünwald-Giemsa Färbung eines BALF Zytospots. 22

Abbildung 6: Aufbau des Blotting-Sandwiches 32

Abbildung 7: Lichtmikroskopische Bilder der Proben während der Lasermikrodissektion. 36

Abbildung 8: Lasermikroskop..... 36

Abbildung 9: Schema zur Stimulation. 40

Abbildung 10: Statistische Auswertung der Unterschiede der BALF-Gesamtzellzahl .. 42

Abbildung 11: Statistische Auswertung des Vergleiches der prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen zwischen PBS- und OVA-Gruppe. 43

Abbildung 12: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid. 44

Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid. 45

Abbildung 14: Lichtmikroskopisches Bild der Proben während der laserassistierten Mikrodissektion. 46

Abbildung 15: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR-Produkte von Proben, die mittels laserassistierter Mikrodissektion gewonnen wurden, in einem 2%igen Agarose-Gel und Markierung mit Ethidiumbromid. 47

Abbildung 16: Statistischer Vergleich der mittels qPCR gemessenen mRNA-Expression zwischen PBS- und OVA-Gruppe. 47

Abbildung 17: Immunhistologische Untersuchung von Lunge und Trachea. 49

Abbildung 18 a und b: Immunhistologische Untersuchung der Lungen- und Trachealschnitte aus der PBS- und OVA-Gruppe im Vergleich. 51

Abbildung 19: Präabsorptionskontrolle des GDNF-Antikörpers im Westernblot. 53

Abbildung 20: Präabsorptionskontrolle des Artemin-Antikörpers im Westernblot. 53

Abbildung 21: Validierung der Sekundärantikörper im Westernblot. 54

Abbildung 22: Westernblot und Ponceaufärbung von Lungenlysaten aus der PBS- und OVA-Gruppe. 56

Abbildung 23: Statistische Auswertung des Vergleiches der Signalstärken der GDNF-/Artemin-Immunmarkierung zwischen PBS- und OVA-Gruppe. 57

Abbildung 24: Statistische Auswertung des Einflusses von GDNF und Artemin auf die prozentualen Anteile CPS- und ZA-reaktiven Neurone. 59

Abbildung 25: Statistische Auswertung des Einflusses der GDNF-Inkubation für 4 h und 24 h, auf das CPS-abhängige $\Delta[Ca^{2+}]_i$ der CPS^+ Neurone des Ggl. nodosum. 60

Abbildung 26: Statistische Auswertung des Einflusses der Artemin-Inkubation für 4 h und 24 h, auf das CPS-abhängige $\Delta[Ca^{2+}]_i$ der CPS^+ Neurone des Ggl. jugulare. 61

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2: Mastermixansatz zur cDNA Synthese 24

Tabelle 3: Mastermix für die qualitative PCR bei 1,5 mM und 2,5 mM $MgCl_2$ 24

Tabelle 4: Primer 25

Tabelle 6: 50x TAE Puffer 27

Tabelle 7: Primärantikörper für die Immunhistochemie 28

Tabelle 8: Sekundärantikörper für die Immunhistochemie 28

Tabelle 9: PBS; phosphatgepufferte Salzlösung; pH 7,4. 28

Tabelle 10: Antigene zur Präabsorption 28

Tabelle 11: Gepuffertes Glycerol 28

Tabelle 12: Harnstoffpuffer 30

Tabelle 13: 5x Probenpuffer 31

Tabelle 14: Sammelgel und Trenngel 15% 31

Tabelle 15: Puffer für Westernblot 32

Tabelle 16: Primärantikörper 33

Tabelle 17: Westernblot (WB) Antigene zur Präabsorption 33

Tabelle 18: Sekundärantikörper 33

Tabelle 19: Mastermix für die RT 37

Tabelle 20: Protokoll der RT 37

Tabelle 21: Nervenwachstumsfaktoren und Zytokine zur Inkubation 39

Tabelle 22: Zusammenfassung der RT-PCR-Ergebnisse von Proben, die mit Hilfe der laserassistierten Mikrodissektion gewonnen wurden. 46

10 Literaturverzeichnis

Airaksinen, M.S. & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature*. 3 (5). 383–394.

Airaksinen, M.S., Titievsky, A. & Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Molecular and Cellular Neuroscience*. 13 (5). 313–325.

Andrè, E., Campi, B., Materazzi, S., Trevisani, M., Amadesi, S., Massi, D., Creminon, C., Vaksman, N., Nassini, R., Civelli, M., Baraldi, P.G., Poole, D.P., Bunnett, N.W., Geppetti, P. & Patacchini, R. (2008). Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by α,β-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *Journal of Clinical Investigation*. 118 (7). 2574–2582.

Baloh, R.H., Gorodinsky, A., Golden, J.P., Tansey, M.G., Keck, C.L., Popescu, N.C., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1998a). GFRα3 is an orphan member of the GDNF/neurturin/persephin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (10). 5801–5806.

Baloh, R.H., Tansey, M.G., Golden, J.P., Creedon, D.J., Heuckeroth, R.O., Keck, C.L., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1997). TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron*. 18 (5). 793–802.

Baloh, R.H., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Fahrner, T.J., Enomoto, H., Simburger, K.S., Leitner, M.L., Araki, T., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1998b). Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRα3-RET receptor complex. *Neuron*. 21 (6). 1291–1302.

Barnes, P.J. (1992). Modulation of neurotransmission in airways. *Physiological Reviews*. 72 (3). 699–729.

Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I. & Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 124 (6). 1269–1282.

Belvisi, M.G. (2002). Overview of the innervation of the lung. *Current Opinion in Pharmacology*. 2. 211–215.

Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A.C., Kulesskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H. & Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *The Journal of Cell Biology*. 192 (1). 153–169.

Bessac, B.F., Sivula, M., von Hehn, C.A., Escalera, J., Cohn, L. & Jordt, S.E. (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *Journal of Clinical Investigation*. 118 (5). 1899–1910.

Bhave, G., Hu, H.-J., Glauner, K.S., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D.J., Oxford, G.S. & Gereau, R.W. (2003). Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (21). 12480–12485.

Böhmer, R. (2016). *Die Expression und entzündungsabhängige Regulation von Fibroblast Growth Factor-Rezeptoren in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen und der Rezeptor-Liganden in der Mauslunge*.

Braun, A., Lommatzsch, M., Lewin, G.R., Virchow, J.C. & Renz, H. (1999). Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *International Archives of Allergy and Immunology*. 118. 163–165.

Braun, A., Lommatzsch, M., Neuhaus-Steinmetz, U., Quarcoo, D., Glaab, T., McGregor, G.P., Fischer, A. & Renz, H. (2004). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) contributes to neuronal dysfunction in a model of allergic airway inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 141 (3). 431–440.

Braun, A., Quarcoo, D., Schulte Herbrüggen, O., Lommatzsch, M., Hoyle, G. & Renz, H. (2001). Nerve growth factor induces airway hyperresponsiveness in mice. *International Archives of Allergy and Immunology*. 124. 205–207.

Butler, C., McQuaid, S., Warke, T., Stevenson, M., Heaney, L.G. & McGarvey, L. (2010). The sensory receptor TRPV1 is expressed in human bronchial epithelium and upregulated in refractory (steroid resistant) asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 181. A2490.

Butte, M.J. (2001). Neurotrophic factor structures reveal clues to evolution, binding, specificity, and receptor activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 58 (8). 1003–1013.

Caceres, A.I., Brackmann, M., Elia, M.D., Bessac, B.F., del Camino, D., D'Amours, M., Witek, J.S., Fanger, C.M., Chong, J.A., Hayward, N.J., Homer, R.J., Cohn, L., Huang, X., Moran, M.M. & Jordt, S.-E. (2009). A sensory neuronal ion channel essential for airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (22). 9099–9104.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389 (6653). 816–824.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M. V & Julius, D. (2001). Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature*. 411 (6840). 957–962.

Davis, B., Roberts, A.M., Coleridge, H.M. & Coleridge, J.C. (1982). Reflex tracheal gland secretion evoked by stimulation of bronchial C-fibers in dogs. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*. 53 (4). 985–991.

Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A. & Sheardown, S.A. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 405 (6783). 183–187.

Deberry, J.J., Bielefeldt, K., Davis, B.M., Szigethy, E.M., Hartman, D.J. & Coates, M.D. (2014). Abdominal pain and the neurotrophic system in ulcerative colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 20 (12). 2330–2339.

Deutsche Atemwegsliga e.V. & Deutsche Gesellschaft für Pneumologie (2005). *Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Asthma*.

Dinh, Q.T., Suhling, H., Fischer, A., Braun, A. & Welte, T. (2011). Neuronale Kontrolle bei chronisch entzündlichen und obstruktiven Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale und COPD. *Pneumologie*. 65 (5). 283–292.

DiStefano, P.S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schick, C.M., Lindsay, R.M. & Wiegand, S.J. (1992). The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 8 (5). 983–993.

Driessen, A.K., Farrell, M.J., Mazzone, S.B. & McGovern, A.E. (2015). The role of the paratrigeminal nucleus in vagal afferent evoked respiratory reflexes: a neuroanatomical and functional study in guinea pigs. *Frontiers in Physiology*. 6 (DEC). 1–11.

Dunzendorfer, S., Meierhofer, C. & Wiedermann, C.J. (1998). Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 64 (6). 828–834.

Elitt, C.M., McIlwrath, S.L., Lawson, J.J., Malin, S.A., Molliver, D.C., Cornuet, P.K., Koerber, H.R., Davis, B.M. & Albers, K.M. (2006). Artemin overexpression in skin enhances expression of TRPV1 and TRPA1 in cutaneous sensory neurons and leads to behavioral sensitivity to heat and cold. *The Journal of Neuroscience*. 26 (33). 8578–8587.

Enokido, Y., de Sauvage, F., Hongo, J.A., Ninkina, N., Rosenthal, A., Buchman, V.L. & Davies, A.M. (1998). GFRα-4 and the tyrosine kinase Ret form a functional receptor complex for persephin. *Current Biology*. 8 (18). 1019–1022.

Fischer, A., Canning, B.J. & Kummer, W. (1996). Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation. *Annals New York Academy of Sciences*. 805. 717–722.

Fox, A., Barnes, P., Urban, L. & Dray, A. (1993). An in vitro study of the properties of single vagal afferents innervating guinea-pig airways. *The Journal of Physiology*. 469. 21–35.

Freissmuth, M., Offermanns, S. & Böhm, S. (2012). *Pharmakologie & Toxikologie*.

Global Initative for Asthma (2015). *Global strategy for asthma management and prevention (2015 update)*.

Golden, J.P., DeMaro, J.A., Osborne, P.A., Milbrandt, J. & Johnson, E.M. (1999). Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Experimental Neurology*. 158 (2). 504–528.

Herdegen, T. (2008). *Kurzlehrbuch Pharmakologie*.

Herold, G. (2013). *Herold Innere Medizin*.

Herz, U., Braun, A., Rückert, R. & Renz, H. (1998). Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clinical and Experimental Allergy*. 28 (5). 625–634.

Heuckeroth, R.O., Enomoto, H., Grider, J.R., Golden, J.P., Hanke, J.A., Jackman, A., Molliver, D.C., Bardgett, M.E., Snider, W.D., Johnson, E.M., Milbrandt, J. & Louis, S. (1999). Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. *Neuron*. 22. 253–263.

Holtmann, H., Braun, M. & Renz-Polster, H. (2013). *Mediscript Staatsexamen Repetitorium zur Immunologie*.

Ibáñez, C.F. (2013). Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5 (2). 1–11.

Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A. & Szolcsányi, J. (1967). Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. 31 (1). 138–151.

Jiang, X., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P. & Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*. 127 (8). 1607–1616.

Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J.C., Hu, S., Altrock, B.W. & Fox, G.M. (1996). GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-α, a novel receptor for GDNF. *Cell*. 85. 1113–1124.

Jing, S., Yu, Y., Fang, M., Hu, Z., Holst, P.L., Boone, T., Delaney, J., Schultz, H., Zhou, R. & Fox, G.M. (1997). GFRα-2 and GFRα-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *Journal of Biological Chemistry*. 272 (52). 33111–33117.

Kassel, O., De Blay, F., Duvernelle, C., Olgart, C., Israel-Biet, D., Krieger, P., Moreau, L., Muller, C., Pauli, G. & Frossard, N. (2001). Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clinical and Experimental Allergy*. 31 (9). 1432–1440.

Klein, R.D., Sherman, D., Ho, W.H., Stone, D., Bennett, G.L., Moffat, B., Vandlen, R., Simmons, L., Gu, Q., Hongo, J.A., Devaux, B., Poulsen, K., Armanini, M., Nozaki, C., Asai, N., Goddard, A., Phillips, H., Henderson, C.E., Takahashi, M. & Rosenthal, A. (1997). A GPI-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature*. 387 (6634). 717–721.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A. & Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with Aδ/C-fibers and colocalization with Trk receptors. *Journal of Comparative Neurology*. 493 (4). 596–606.

Kotzbauer, P.T., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Golden, J.P., Creedon, D.J., Johnson, E.M. & Milbrandt, J. (1996). Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*. 384 (6608) p.467–470.

Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R. & Heym, C. (1992a). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*. 49 (3). 715–737.

Kummer, W., Fischer, A., Mundel, P., Mayer, B., Hoba, B., Philippin, B. & Preissler, U. (1992b). Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. *Neuroreport*. 3 (7). 653–655.

Lee, L.-Y., Shuei Lin, Y., Gu, Q., Chung, E. & Ho, C.-Y. (2003). Functional morphology and physiological properties of bronchopulmonary C-fiber afferents. *The Anatomical Record. Part A*. 270A (1). 17–24.

Leitner, M.L., Molliver, D.C., Osborne, P.A., Vejsada, R., Golden, J.P., Lampe, P.A., Kato, A.C., Milbrandt, J. & Johnson, E.M. (1999). Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRα coreceptor-specific. *The Journal of Neuroscience*. 19 (21). 9322–9331.

Lieu, T., Kollarik, M., Myers, A.C. & Undem, B.J. (2011). Neurotrophin and GDNF family ligand receptor expression in vagal sensory nerve subtypes innervating the adult guinea pig respiratory tract. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 300 (5). L790–L798.

Lieu, T.M., Myers, A.C., Meeker, S. & Undem, B.J. (2012). TRPV1 induction in airway vagal low-threshold mechanosensory neurons by allergen challenge and neurotrophic factors. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 302 (9). L941–L948.

Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S. & Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 260 (5111). 1130–1132.

Lindahl, M., Poteryaev, D., Yu, L., Arumäe, U., Timmusk, T., Bongarzone, I., Aiello, A., Pierotti, M.A., Airaksinen, M.S. & Saarma, M. (2001). Human glial cell line-derived neurotrophic factor receptor α4 is the receptor for persephin and is predominantly expressed in normal and malignant thyroid medullary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (12). 9344–9351.

Lindahl, M., Timmusk, T., Rossi, J., Saarma, M. & Airaksinen, M.S. (2000). Expression and alternative splicing of mouse Gfrα4 suggest roles in endocrine cell development. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 15 (6). 522–533.

Löffler, G. & Petrides, P.E. (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*. 8. Auflage.

Lommatzsch, M., Braun, A., Mannsfeldt, A., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N. V., Paus, R., Fischer, A., Lewin, G.R. & Renz, H. (1999). Abundant production of brain-derived neurotrophic factor by adult visceral epithelia. *The American Journal of Pathology*. 155 (4). 1183–1193.

Lonka-Nevalaita, L., Lume, M., Leppänen, S., Jokitalo, E., Peränen, J. & Saarma, M. (2010). Characterization of the intracellular localization, processing, and secretion of two glial cell line-derived neurotrophic factor splice isoforms. *The Journal of Neuroscience*. 30 (34). 11403–11413.

Malin, S.A., Molliver, D.C., Koerber, R., Cornuet, P., Frye, R., Albers, K.M. & Davis, B.M. (2006). Glial cell line-derived neurotrophic factor family members sensitize nociceptors in vitro and produce thermal hyperalgesia in vivo. *The Journal of Neuroscience*. 26 (33). 8588–8599.

Martling, C.R., Matran, R., Alving, K., Hökfelt, T. & Lundberg, J.M. (1990). Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone in the pig. *Cell and Tissue Research*. 260 (2). 223–233.

Martling, C.R., Saria, A., Fischer, J.A., Hökfelt, T. & Lundberg, J.M. (1988). Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect. *Regulatory Peptides*. 20 (2). 125–139.

Mauffray, M., Domingues, O., Hentges, F., Zimmer, J., Hanau, D. & Michel, T. (2015). Neurturin influences inflammatory responses and airway remodeling in different mouse asthma models. *The Journal of Immunology*. 194 (4). 1423–1433.

McDonald, D.M. (1987). Neurogenic inflammation in the respiratory tract: actions of sensory nerve mediators on blood vessels and epithelium of the airway mucosa. *The American Review of Respiratory Disease*. 136 (6 Pt 2). S65–S72.

McGovern, A.E., Driessen, A.K., Simmons, D.G., Powell, J., Davis-Poynter, N., Farrell, M.J. & Mazzone, S.B. (2015). Distinct brainstem and forebrain circuits receiving tracheal sensory neuron inputs revealed using a novel conditional anterograde transsynaptic viral tracing system. *The Journal of Neuroscience*. 35 (18). 7041–7055.

Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M. & Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 287 (5457). 1489–1493.

Michael, G.J. & Priestley, J. V. (1999). Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *The Journal of Neuroscience*. 19 (5). 1844–1854.

Michel, T., Thérésine, M., Poli, A., Domingues, O., Ammerlaan, W., Brons, N.H.C., Hentges, F. & Zimmer, J. (2011). Increased Th2 cytokine secretion, eosinophilic airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in neurturin-deficient mice. *Journal of Immunology*. 186 (11). 6497–6504.

Milbrandt, J., de Sauvage, F.J., Fahrner, T.J., Baloh, R.H., Leitner, M.L., Tansey, M.G., Lampe, P.A., Heuckeroth, R.O., Kotzbauer, P.T., Simburger, K.S., Golden, J.P., Davies, J.A., Vejsada, R., Kato, A.C., Hynes, M., Sherman, D., Nishimura, M., Wang, L.C., Vandlen, R., Moffat, B., Klein, R.D., Poulsen, K., Gray, C., Garces, A. & Johnson, E.M. (1998). Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*. 20 (2). 245–253.

Montell, C., Birnbaumer, L. & Flockerzi, V. (2002a). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell*. 108 (5). 595–598.

Montell, C., Birnbaumer, L., Flockerzi, V., Bindels, R.J., Bruford, E.A., Caterina, M.J., Clapham, D.E., Harteneck, C., Heller, S., Julius, D., Kojima, I., Mori, Y., Penner, R., Prawitt, D., Scharenberg, A.M., Schultz, G., Shimizu, N. & Zhu, M.X. (2002b). A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular Cell*. 9 (2). 229–231.

Moore, M.W., Klein, R.D., Fariñas, I., Sauer, H., Armanini, M., Phillips, H., Reichardt, L.F., Ryan, A.M., Carver-Moore, K. & Rosenthal, A. (1996). Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*. 382 (6586). 76–79.

Mortola, J., Sant'ambrogio, G. & Clement, M.G. (1975). Localization of irritant receptors in the airways of the dog. *Respiration Physiology*. 24 (1). 107–114.

Murphy, K.R., Wilson, M.C., Irvin, C.G., Glezen, L.S., Marsh, W.R., Haslett, C., Henson, P.M. & Larsen, G.L. (1986). The requirement for polymorphonuclear leukocytes in the late asthmatic response and heightened airways reactivity in an animal model. *The American Review of Respiratory Disease*. 134 (1). 62–68.

Nassenstein, C., Dawbarn, D., Pollock, K., Allen, S.J., Erpenbeck, V.J., Spies, E., Krug, N. & Braun, A. (2006). Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 118 (3). 597–605.

Nassenstein, C., Kwong, K., Taylor-Clark, T., Kollarik, M., MacGlashan, D.M., Braun, A. & Undem, B.J. (2008). Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *The Journal of Physiology*. 586 (6). 1595–1604.

Nassenstein, C., Taylor-Clark, T.E., Myers, A.C., Ru, F., Nandigama, R., Bettner, W. & Undem, B.J. (2010). Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. *The Journal of Physiology*. 588 (23). 4769–4783.

Nicol, G.D., Lopshire, J.C. & Pafford, C.M. (1997). Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons. *The Journal of Neuroscience*. 17 (3). 975–982.

Nosrat, C.A., Tomac, A., Lindqvist, E., Lindskog, S., Humpel, C., Strömberg, I., Ebendal, T., Hoffer, B.J. & Olson, L. (1996). Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell and Tissue Research*. 286 (2). 191–207.

Nowak, D., Grimminger, F., Jörres, R., Oldigs, M., Rabe, K.F., Seeger, W. & Magnussen, H. (1993). Increased LTB4 metabolites and PGD2 in BAL fluid after methacholine challenge in asthmatic subjects. *European Respiratory Journal*. 6 (3). 405–412.

Paratcha, G., Ledda, F. & Ibáñez, C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*. 113 (7). 867–879.

Päth, G., Braun, A., Meents, N., Kerzel, S., Quarcoo, D., Raap, U., Hoyle, G.W., Nockher, W.A. & Renz, H. (2002). Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 166 (6). 818–826.

Pedersen, S.F., Owsianik, G. & Nilius, B. (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 38 (3–4). 233–252.

Piccinini, E. (2014). *Neurotrophic factors GDNF and NRTN: from basic properties to clinical trials*.

Pichel, J.G., Shen, L., Sheng, H.Z., Granholm, A.C., Drago, J., Grinberg, A., Lee, E.J., Huang, S.P., Saarma, M., Hoffer, B.J., Sariola, H. & Westphal, H. (1996). Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature*. 382 (6586). 73–76.

Ricco, M.M., Kummer, W., Biglari, B., Myers, A.C. & Undem, B.J. (1996). Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. *The Journal of Physiology*. 496 (2). 521–530.

Sánchez, M.P., Silos-Santigo, I., Frisén, J., He, B., Lira, S.A. & Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*. 382 p.70–73.

Sant'Ambrogio, G. (1982). Information arising from the tracheobronchial tree of mammals. *Physiological Reviews*. 62 (2). 531–569.

Sariola, H. & Saarma, M. (2003). Novel functions and signalling pathways for GDNF. *Journal of Cell Science*. 116 (19). 3855–3862.

Van Schoor, J., Pauwels, R. & Joos, G. (2005). Indirect bronchial hyper-responsiveness: the coming of age of a specific group of bronchial challenges. *Clinical and Experimental Allergy*. 35 (3). 250–261.

Shu, X. & Mendell, L.M. (2001). Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *Journal of Neurophysiology*. 86 (6). 2931–2938.

Springall, D.R., Cadieux, A., Oliveira, H., Su, H., Royston, D. & Polak, J.M. (1987). Retrograde tracing shows that CGRP-immunoreactive nerves of rat trachea and lung originate from vagal and dorsal root ganglia. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 20 (2). 155–166.

Stoeckel, K., Schwab, M. & Thoenen, H. (1975). Specificity of retrograde transport of nerve growth factor (NGF) in sensory neurons: a biochemical and morphological study. *Brain Research*. 89 (1). 1–14.

Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*. 112 (6). 819–829.

Suter-Crazzolara, C. & Unsicker, K. (1994). GDNF is expressed in two forms in many tissues outside the CNS. *Neuroreport*. 5 (18). 2486–2488.

Takahashi, M. & Cooper, G.M. (1987). Ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Molecular and Cellular Biology*. 7 (4). 1378–1385.

Taylor-Clark, T.E. & Undem, B.J. (2010). Ozone activates airway nerves via the selective stimulation of TRPA1 ion channels. *The Journal of Physiology*. 588 (3). 423–433.

Taylor-Clark, T.E., Undem, B.J., MacGlashan, D.W., Ghatta, S., Carr, M.J. & McAlexander, M.A. (2008). Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Molecular Pharmacology*. 73 (2). 274–281.

Thompson, J., Doxakis, E., Pinon, L.G., Strachan, P., Buj-Bello, A., Wyatt, S., Buchman, V.L. & Davies, A.M. (1998). GFRα-4, a new GDNF family receptor. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 11 (3). 117–126.

Tollet, J., Everett, A.W. & Sparrow, M.P. (2002). Development of neural tissue and airway smooth muscle in fetal mouse lung explants: a role for glial-derived neurotrophic factor in lung innervation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 26 (4). 420–429.

Tomac, A., Widenfalk, J., Lin, L.F., Kohno, T., Ebendal, T., Hoffer, B.J. & Olson, L. (1995). Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (18). 8274–8278.

Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I. & Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21 (3). 531–543.

Tränkner, D., Hahne, N., Sugino, K., Hoon, M.A. & Zuker, C. (2014). Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (31). 11515–11520.

Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D.M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andrè, E., Patacchini, R., Cottrell, G.S., Gatti, R., Basbaum, A.I., Bunnett, N.W., Julius, D. & Geppetti, P. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (33). 13519–13524.

Trupp, M., Rydén, M., Jörnvall, H., Funakoshi, H., Timmusk, T., Arenas, E. & Ibáñez, C.F. (1995). Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *The Journal of Cell Biology*. 130 (1). 137–148.

Undem, B.J. & Carr, M.J. (2002). The role of nerves in asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2 (2). 159–165.

Undem, B.J., Chuaychoo, B., Lee, M.-G., Weinreich, D., Myers, A.C. & Kollarik, M. (2004). Subtypes of vagal afferent C-fibres in guinea-pig lungs. *The Journal of Physiology*. 556 (3). 905–917.

Undem, B.J. & Nassenstein, C. (2009). Airway nerves and dyspnea associated with inflammatory airway disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 167 (1). 36–44.

Undem, B.J. & Weinreich, D. (1993). Electrophysiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. *Journal of the Autonomic Nervous System*. 44 (1). 17–33.

Virchow, J.C., Julius, P., Lommatzsch, M., Luttmann, W., Renz, H. & Braun, A. (1998). Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 158 (6). 2002–2005.

Watanabe, N., Horie, S., Michael, G.J., Spina, D., Page, C.P. & Priestley, J. V. (2005). Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 18 (3). 187–197.

Weigt, H., Nassenstein, C., Tschernig, T., Mühlradt, P.F., Krug, N. & Braun, A. (2005). Efficacy of macrophage-activating lipopeptide-2 combined with interferon-γ in a murine asthma model. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 172 (5). 566–572.

Widdicombe, J.G. (1982). Pulmonary and respiratory tract receptors. *The Journal of Experimental Biology*. 100. 41–57.

Widenfalk, J., Nosrat, C., Tomac, A., Westphal, H., Hoffer, B. & Olson, L. (1997). Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-β (GDNFR-β), novel proteins related to GDNF and GDNFR-α with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *The Journal of Neuroscience*. 17 (21). 8506–8519.

Xian, C.J., Huang, B.R. & Zhou, X.F. (1999). Distribution of neurturin mRNA and immunoreactivity in the peripheral tissues of adult rats. *Brain Research*. 835 (2). 247–258.

Zhuo, H., Ichikawa, H. & Helke, C.J. (1997). Neurochemistry of the nodose ganglion. *Progress in Neurobiology*. 52 (2). 79–107.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D. a, Chuang, H., Sørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D. & Högestätt, E.D. (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 400 (6743). 452–457.

11 Publikationsverzeichnis

11.1 Posterpräsentationen

Weske A. Nandigama R., Kummer W., Nassenstein C. (2012)
Artemin alters the functional properties of jugular C-fibers.
UGMLC/DZL Symposium: Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases, 21.-23.6.2012 Marburg

Nandigama R., Weske A., Wiegand S., Kummer W., Nassenstein C. (2012)
Mechanism of bronchopulmonary C-fiber hyperexcitability in allergic asthma: Loss of TRPV1 inhibition by GDNF-downregulation?
UGMLC/DZL Symposium: Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases, 21.-23.6.2012 Marburg

Weske A., Wiegand S., Nandigama R., Kummer W., Nassenstein C. (2012)
Effekte von Artemin auf die Sensibilität von TRPA1 und TRPV1 in C-Faser-Neuronen des sensorischen Ggl. Jugulare. 29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, 26.09.2012 bis 28.09.2012 in Würzburg.

R. Nandigama, A. Weske, S. Wiegand, W. Kummer, C. Nassenstein (2012)
GDNF reduziert die Sensibilität der TRPV1-Rezeptoren in C-Faser-Neuronen des Ggl. Nodosum . 29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft,
26.09.2012 bis 28.09.2012 in Würzburg.

A. Weske, S. Wiegand, R. Nandigama, W. Kummer, C. Nassenstein (2013)
Neurturin expression in a mouse model of allergic asthma and its effects on vagal sensory C-fibers. 8. Kongress der International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) und 15. Treffen der European Federation of Autonomic Societies (EFAS), 29.07.2013-02.08.2013 Gießen.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Koblenz den 05.11.2016 Annette Weske

13 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Wolfgang Kummer und Dr. Christina Nassenstein sehr herzlich für die Überlassung des Themas und Ihre hervorragende, engagierte und geduldige wissenschaftliche Betreuung der Arbeit danken. Christina danke ich zudem für die unzähligen gemeinsamen Kilometer und die vielen Stunden in allen erdenklichen Präparationsgebieten.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der „AG-Pandastein“ für die gute Zusammenarbeit. Vor allem Rajender und Silke, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mir bei allen denkbaren Problemen weiterhalfen und den Mitdoktoranden Georg und Jae gilt mein Dank. Besonders bedanken möchte ich mich bei Rebecca, die eine wichtige Freundin für mich geworden ist, für ihre fachliche und mehr noch für ihre moralische Unterstützung beim Erstellen dieser Arbeit.

Zudem danke ich dem ganzen Team der kardiopulmonalen Neurobiologie für die freundliche Zusammenarbeit und die großen und kleinen Hilfen im Arbeitsalltag. Besonders hervorheben möchte ich Patricia Berger für die große organisatorische Hilfe bei der Verwirklichung des Projekts aus der Entfernung.

Ein weiterer großer Dank gilt Professor Schreckenberger, dem ich meine ersten Einblicke in die medizinische Klinik und Forschung zu verdanken habe und der mir als Arzt immer ein Vorbild war und sein wird.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden Sabrina, Fabs, Mocki, Elisa und Sini, dem BdP und meiner Familie, meinen Eltern, meinen Geschwistern Matthias, Icki und Michel mit ihren Kindern und Partnern und Jan, dafür, dass sie immer für mich da sind und mich unterstützen.