

**Quantitative Veränderungen Dendritischer Zellen in  
Ganglien der Atemwegsinnervation des Meerschweinchens  
nach Sensibilisierung und Allergenprovokation**

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

vorgelegt von Ulrike Brenner  
aus Mönchengladbach

Gießen 2005

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
Leiter: Prof. Dr. Kummer  
des Fachbereichs Medizin

Gutachter: Prof. Dr. Kummer  
Gutachter: Prof Dr. Dr. Grimminger  
Tag der Disputation: 06.09.2005

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Die autonome efferente und sensible Innervation der unteren Atemwege und der Lunge.....	2
1.1.1	Sympathische Innervation.....	2
1.1.2	Parasympathische Innervation.....	3
1.1.3	Sensible Innervation.....	3
1.2	Veränderungen der Atemwegsinnervation bei der allergischen Entzündungsreaktion.....	5
1.2.1	Sympathische Innervation.....	5
1.2.2	Parasympathische Innervation.....	5
1.2.3	Sensible Innervation.....	6
1.3	Die Dendritische Zelle als Schlüsselzelle des allergischen Asthma.....	7
1.3.1	Antigenkontakt.....	7
1.3.2	Antigenaufnahme.....	9
1.3.3	Antigenprozessierung.....	10
1.3.4	Migration.....	11
1.3.5	Antigenpräsentation.....	12
1.4	Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem.....	14
1.4.1	Neuronale Einflüsse auf Zellen des Immunsystems.....	14
1.4.2	Immunologische Einflüsse auf Zellen des Nervensystems.....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1	Material.....	16
2.1.1	Tiere.....	16
2.1.2	Primärantikörper.....	16
2.1.3	Sekundärantikörper.....	16
2.1.4	Tertiärreagenz.....	17
2.1.5	Reagenzien und Zusammensetzungen der Lösungen.....	17
2.1.6	Geräte.....	19
2.1.7	Filmmaterial.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Versuchsgruppen.....	20
2.2.2	Allergisierungsschema.....	20
2.2.3	Tierpräparation.....	20

2.2.4	Gewebebehandlung.....	21
2.2.5	Anfertigung der Gewebeschnitte .....	21
2.2.6	Immunhistochemie.....	21
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopie .....	23
2.2.8	Fotodokumentation .....	23
2.2.9	Auswertung .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	Bronchialschleimhaut.....	27
3.2	Lokale Atemwegsganglien.....	29
3.3	Ganglia nodosa.....	32
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>36</b>
4.1	Das Meerschweinchen als Modell des allergischen Asthmabronchiale .....	36
4.2	Bronchialschleimhaut.....	39
4.3	Ganglion nodosum .....	40
4.4	Lokale Atemwegsganglien.....	43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis. ....</b>	<b>60</b>

## 1 Einleitung

Die Regulation der Atemwegsfunktionen - Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, Sekretion der seromukösen Drüsen, Durchblutung - erfolgt unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch das Nervensystem (Lundberg et al. 1988). Auch bei pathologischen Veränderungen der Atemwege, wie sie beim allergischen Asthma vorkommen, sind neural freigesetzte Mediatoren bedeutsam (Barnes 1986). Andererseits ist die allergische Entzündung im wesentlichen durch immunologische Vorgänge gekennzeichnet (Bochner et al. 1994). Als auslösendes Ereignis wird dabei die Antigen-abhängige Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Mastzellen angesehen (Schwartz 1994; Wasserman 1994). Bei der Initiation dieser immunologischen Vorgänge nehmen Dendritische Zellen (DC) eine Schlüsselstellung ein; sie phagozytieren das Antigen in der Atemwegsschleimhaut und präsentieren es in den regionalen Lymphknoten den T-Zellen. Sie stehen damit am Beginn der allergischen Immunreaktion (Masten et al. 1997).

Lange Zeit wurden immunologische und nervale Prozesse nur getrennt voneinander betrachtet. In den letzten Jahren werden auch ihre Verknüpfungspunkte näher untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem bei allergischen Erkrankungen wie dem Asthma bronchiale eine große Rolle spielen (Ader et al. 1995). So sind Neuropeptide wie Substanz P (SP) und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), die von sensiblen Nervenfasern freigesetzt werden, wesentlich an der Regulation von Zellen des Immunsystems beteiligt (Felten 1991). In umgekehrter Weise wurde jedoch auch gezeigt, dass Entzündungsmediatoren aus Immunzellen die Aktivität von Neuronen und deren Mediatorstoffwechsel beeinflussen können (Fischer et al. 1996; Weinreich et al. 1987). Die Wirkung Dendritischer Zellen auf Neurone ist bislang unklar. Es ist jedoch bekannt, dass Dendritische Zellen in ihrer Funktion wesentlich durch CGRP aus sensiblen Nervenendigungen beeinflusst werden (Hosoi et al. 1993). Aufgrund dieser funktionellen Verbindung zwischen Dendritischen Zellen und Neuronen wurden in der hier vorliegenden Studie an einem Meerschweinchen-Modell der Atemwegsentzündung folgende Fragen untersucht:

Sind Dendritische Zellen auch in den die Lunge versorgenden intrinsischen (parasymphatischen) und extrinsischen (sensiblen) Ganglien zu finden?

Kommt es durch Sensibilisierung und inhalative Allergenprovokation zu Veränderungen des Verhältnisses zwischen Dendritischen Zellen und Neuronen?

Zur näheren Einführung in das Thema folgt eine Übersicht über die Innervation der Lunge, Veränderungen der Atemwegsinnervation bei der allergischen Entzündungsreaktion, die Dendritische Zelle als Schlüsselzelle des allergischen Asthma sowie bekannte Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem.

## **1.1 Die autonome efferente und sensible Innervation der unteren Atemwege und der Lunge**

Die unteren Atemwege und die Lunge werden durch Äste des N. vagus (N. laryngeus recurrens, Rr. bronchiales) und des Truncus sympathicus (Rr. pulmonales) innerviert. Die Innervation beinhaltet sympathische, parasympathische und sensorische Anteile.

### **1.1.1 Sympathische Innervation**

Das zentrale vegetative Zentrum der sympathischen Innervation liegt in der intermediären Zone des Brustmarks. Von dort ziehen die präganglionären sympathischen Fasern über die Vorderwurzeln und die Rami communicantes albi zu den paravertebralen Grenzstrangganglien, im wesentlichen dem Ganglion cervicale superius, medius und Ganglion stellatum sowie den beiden darunter liegenden thorakalen Ganglien (Kummer et al. 1992). Hier erfolgt die Umschaltung auf postganglionäre Neurone, deren Axone mit den Rr. pulmonales zur Lunge ziehen. Ein großer Teil der die Trachea des Meerschweinchens versorgenden postganglionären Fasern entstammt dem Ganglion cervicale superius (Baluk et Gabella 1987; Smith et Satchell 1985), während die sympathische Versorgung der Lunge selbst hauptsächlich durch das Ganglion stellatum erfolgt (Kummer et al. 1992). Als Mediatoren der postganglionären Neurone kommen neben Noradrenalin auch Stickstoffmonoxid (NO) und Neuropeptide wie vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) vor (Lundberg et al. 1988; Maggi et al. 1995). Die sympathischen Fasern enden in der glatten Atemwegsmuskulatur; über Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren führen sie zu einer Erweiterung der Bronchien. Die sympathische Innervation ist beim Menschen jedoch im Gegensatz zum Meerschweinchen insgesamt relativ gering ausgebildet (Doidge et Satchall 1982;

Sheppard et al. 1983; Smith et Satchell 1985). Ihre funktionelle Bedeutung ist besonders in Ruhe untergeordnet.

### **1.1.2 Parasympathische Innervation**

Die präganglionären parasympathischen Neurone liegen im Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi des Hirnstamms. Die Fasern dieser Neurone ziehen zum Teil mit dem N. laryngeus recurrens zu den kleinen intramuralen Ganglien der Trachea (Myers et al. 1988; Myers et al. 1990), ein anderer Teil erreicht die postganglionären Neurone über die vagalen Rami bronchiales, die in Höhe des Lungenhilums aus dem N. vagus entspringen (Hollenberg 1986). Der wichtigste Mediator der postganglionären parasympathischen Neurone ist Acetylcholin (Fischer et al. 1996). Die postganglionären Neurone enthalten aber auch den Bronchodilatator VIP und NO-Synthase (Fischer et Hoffmann 1996). Beim Meerschweinchen handelt es sich hierbei um eine separate Gruppe von parasympathischen Neuronen, die unabhängig von den cholinergen Nervenzellen eine Bronchuserweiterung bewirken (Canning et al. 1998). Parasympathische Fasern versorgen die glatte Muskulatur der Trachea, Bronchi und Bronchioli (Partanen et al. 1982), die Drüsen und sekretorischen Zellen des Epithels sowie die großen Pulmonalgefäße. Parasympathische Innervation führt zu Bronchokonstriktion und Schleimsekretion.

### **1.1.3 Sensible Innervation**

Afferente Nervenfasern ziehen von den Atemwegen mit den präganglionären parasympathischen Nervenfasern im N. vagus zum Hirnstamm oder mit den sympathischen Nervenfasern zum Rückenmark. Die zugehörigen Zellkörper liegen im Ganglion jugulare, im Ganglion nodosum und in den Spinalganglien (Kummer et al. 1992). Von den Ganglia nodosum und jugulare gelangen die Afferenzen mit dem N. vagus zum Nucleus tractus solitarii und zu weiteren Zellgruppen des Atemzentrums im Bereich der ventrolateralen Medulla. Als Mediator spielt Glutamat eine wichtige Rolle. Beim Meerschweinchen enthalten die Ganglia nodosum und jugulare die Somata funktionell und anatomisch unterschiedlicher afferenter Fasern (Riccio et al. 1996). Neuronale Tracing-Studien haben gezeigt, dass fast alle das Neuropeptid Substanz P (SP) enthaltende vagale Neurone, die in die Atemwege des Meerschweinchens projizieren, dem Ganglion jugulare entstammen. Neurofilamentprotein (NF) kommt in fast allen Perikaria der Neurone des Ganglion

nodosum vor, deren Fasern die Trachea des Meerschweinchens versorgen, während dies nur für circa die Hälfte der Perikaria der Neurone des Ganglion jugulare zutrifft. Zudem sind die Perikaria der NF-positiven Neurone größer als die der NF-negativen Neurone des Ganglion jugulare. Die Studie von Riccio et al. (1996) liefert auch Hinweise dafür, dass im Gegensatz zu den A $\delta$ -Fasern des Ganglion nodosum die Mehrheit der A $\delta$ -Fasern des Ganglion jugulare auf Capsaicin reagiert. Capsaicin führt zu einer Freisetzung von Neuropeptiden aus sensiblen Nervenendigungen. Es ist somit anzunehmen, dass die Reaktion der afferenten Fasern, die die Atemwege des Meerschweinchens versorgen, eher von deren ganglionären Ursprung abhängt, als von der jeweiligen Leitungsgeschwindigkeit.

Nach anatomisch-physiologischen Kriterien lassen sich die sensorischen Fasern der Atemwege und der Lunge in drei Typen unterteilen: Dehnungsrezeptoren, Irritanzienrezeptoren und C-Faser-Rezeptoren.

Die Endigungen der Dehnungsrezeptoren liegen in der Atemwegsmuskulatur und reagieren auf Veränderung der Wandspannung. Der durch sie vermittelte Hering-Breuer-Reflex dient dem Schutz der Lunge vor Überdehnung.

Die Endigungen der Irritanzienrezeptoren liegen in der Schleimhaut. Über Irritanzienrezeptoren wird durch gasförmige oder mechanische Reize der Hustenreflex ausgelöst.

Als C-Fasern werden alle sensiblen Fasern bezeichnet, die im Gegensatz zu Dehnungs- und Irritanzienrezeptoren nicht myelinisiert sind. Eine Teilgruppe der C-Fasern dient nicht nur der afferenten Informationsübermittlung, sondern kann nach Stimulation auch unmittelbar entzündungsfördernde Neuropeptide freisetzen. Die wichtigsten dieser Neuropeptide sind die Tachykinine SP und Neurokinin A (NKA), sowie CGRP. Hierdurch kann es zu einer neurogenen Entzündung mit Bronchokonstriktion, Schleimhautschwellung und vermehrter Mukussekretion kommen (Nadel 1990). SP und NKA werden durch dasselbe Gen, das Präprotachykinin (PPT) A Gen, kodiert und haben dieselbe COOH-terminale Aminosäuresequenz, die für die meisten ihrer biologischen Effekte relevant ist (Escher et al. 1982). Beim sensibilisierten Meerschweinchen wurde eine Induktion der PPT A Genexpression 12 Stunden nach Allergenkonfrontation beobachtet (Fischer et al. 1996). Weitere 12 Stunden später ließ sich das entsprechende Peptid im Neuron nachweisen. Von hier aus gelangt es per axonalem Transport in die Lunge (Fischer et al. 1996). SP und NKA wirken am selben Rezeptor, unterscheiden sich

jedoch in ihrer Affinität zu verschiedenen Tachykinin-Rezeptor-Subtypen (Frossard et Advenier 1991). Im Meerschweinchen bewirkt SP im Rahmen der neurogenen Entzündung vor allem über den NK-1-Rezeptor Extravasation und Mukussekretion (Kuo et al. 2003; Lei et al. 1992), während NKA vor allem über den NK-2-Rezeptor Bronchokonstriktion vermittelt (Lou et al. 1992). CGRP wird von denselben Neuronen wie SP und NKA produziert und scheint das wichtigste Neuropeptid bei der Vermittlung der Vasodilatation zu sein (Martling et al. 1988).

## **1.2 Veränderungen der Atemwegsinnervation bei der allergischen Entzündungsreaktion**

### **1.2.1 Sympathische Innervation**

Schon in den 60er Jahren wurden Zellen des Immunsystems in sympathischen Ganglien gefunden (Hollinshead et Gertner 1969). Im oberen Zervikalganglion des Meerschweinchens mit etwa 50000 postganglionären Neuronen kommen durchschnittlich 1550 Mastzellen vor (Undem et al. 1990). Antigengabe führt bei sensibilisierten Tieren zu einer Degranulation der Mastzellen. Durch dabei freiwerdende Mastzellmediatoren wie Histamin, Prostaglandine und Leukotriene kommt es zu einer Verstärkung der synaptischen Übertragung in sympathischen Ganglien (Undem et al. 1990; Weinreich et Undem 1987). Über die Wirkung anderer immunkompetenter Zellen, auch Dendritischer Zellen, auf sympathische Neurone der Atemwege ist kaum etwas bekannt.

### **1.2.2 Parasympathische Innervation**

Auch in parasympathischen, intrinsischen Ganglien kommen Mastzellen vor (Myers et al. 1991). Hier führt die Allergenprovokation sensibilisierter Meerschweinchen einerseits zu einer Depolarisierung der parasympathischen Neurone, andererseits zu einem erniedrigten Akkomodationsverhalten dieser Neurone, so dass die gleiche präganglionäre Stimulation eine 5-fach erhöhte Zahl an Aktionspotentialen im postganglionären Neuron bewirkt. Ähnliche Veränderungen lassen sich durch Prostaglandin D<sub>2</sub> auslösen (Myers et al. 1991).

Auch eosinophile Granulozyten können durch Freisetzung von Mediatoren bei der synaptischen Übertragung im parasympathischen Ganglion zur vermehrten Ausschüttung von Acetylcholin beitragen. Dies wird unter anderem durch eine

Blockade muskarinischer Typ 2-Rezeptoren, die die Acetylcholinausschüttung hemmen, bewirkt (Fryer et Wills-Karp 1991). Es wird vermutet, dass auch Lymphozyten auf parasymphatische Neurone wirken können, da sich mit peribronchialen Lymphknoten auch eine erhöhte bronchiale Hyperreagibilität bei elektrische Feldstimulation übertragen lässt (Larsen et al. 1992).

### **1.2.3 Sensible Innervation**

Anfang der 90er Jahre konnte beim Meerschweinchen gezeigt werden, dass die Antigen-abhängige Aktivierung von Mastzellen über die Freisetzung von Histamin zu einer Freisetzung von Tachykininen aus sensiblen Nervenfasern führt (Ellis et Udem 1992). Schon früher wurde eine enge räumliche Beziehung zwischen SP-immunreaktiven Nervenfasern und Mastzellen beobachtet (Skofitsch et al. 1985). Normalerweise werden in den mechanosensiblen Irritanzien-Rezeptoren des Ganglion nodosum keine Neuropeptide synthetisiert, beim sensibilisierten Meerschweinchen kommt es jedoch nach einmaliger inhalativer Allergenprovokation zu einer vermehrten Expression der PPT A-mRNA im Ganglion nodosum (Fischer et al. 1996; Kummer et Fischer 1995). Am gleichen Modell konnte parallel dazu eine Zunahme der bronchialen Hyperreagibilität beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion der Neuropeptide durch allergische Stimuli beim Entstehen der allergischen Spätreaktion eine Rolle spielt. Neurotrophe Faktoren wie nerve growth factor (NGF) scheinen für die Tachykinin-Genexpression verantwortlich zu sein. Applikation von NGF auf die Atemwege des Meerschweinchens ergab die gleichen Veränderungen, die nach Allergenkonfrontation beobachtet werden konnten (Udem et al. 1999). Es wird vermutet, dass neben einer verstärkten Synthese auch ein verminderter Abbau der Tachykinine bei der Allergie bedeutsam ist. Das abbauende Enzym neutrale Endopeptidase kommt hauptsächlich im respiratorischen Epithel vor (Kummer et Fischer 1991). Darüber hinaus könnte die Wirkung der Tachykinine auch dadurch verstärkt werden, dass die Neurokininrezeptoren bei der allergischen Entzündung hochreguliert werden (Adcock et al. 1993).

## **1.3 Die Dendritische Zelle als Schlüsselzelle des allergischen Asthma**

DC stehen am Anfang der allergischen Reaktion. Sie sind antigenpräsentierende Zellen, die Antigen im Bereich der Atemwege durch Phagozytose und Makropinozytose aufnehmen und zur Präsentation auf der Zelloberfläche prozessieren können. Nach der Antigenaufnahme ändern die DC ihre Morphe - die typischen verzweigten Fortsätze werden reduziert - und wandern via Lymphgefäße zu den regionalen Lymphknoten. Hier präsentieren sie das Antigen naiven T-Lymphozyten, die wiederum B-Lymphozyten zur Produktion von Immunglobulin E (IgE) anregen können. IgE bindet an Oberflächenrezeptoren von Mastzellen. Gerät das Individuum erneut in Kontakt mit dem Antigen, kommt es zu einer Quervernetzung von Mastzell-gebundenem IgE und in der Folge zu einer Degranulation der Mastzellen. Dabei freiwerdende Substanzen, wie zum Beispiel Histamin, spielen eine entscheidende Rolle bei der allergischen Sofortreaktion. Diese ist verbunden mit Bronchokonstriktion, Ödembildung der Atemwegsschleimhaut und erhöhter Schleimsekretion.

DC sind nicht nur für die Reaktion vom Soforttyp, sondern auch für die Spätreaktion, die nach max. 24 Stunden beginnt, mitverantwortlich (Lambrecht et al. 1998). Hier haben die DC im Mausmodell sowohl antigenpräsentierende als auch T-Zell-stimulierende Funktion. Bei der Spätreaktion kommt es über Chemotaxis zu einer Infiltration des Lungengewebes durch Entzündungszellen und nachfolgend zu einer chronischen eosinophilen Entzündung mit Hyperplasie der Schleimdrüsen, Hypertrophie der Muskulatur der Atemwege und Ablagerung von Kollagen und Fibronectin unter der Basalmembran.

### **1.3.1 Antigenkontakt**

In der Schleimhaut der Atemwege kommen DC in Kontakt mit Antigenen. Die Zellen des Atemwegsepithels sind durch tight junctions miteinander verbunden. Tight junctions sind Zellverbindungen an der Spitze der Epithelzelle, die das Epithel gegenüber löslichen Substanzen, Makromolekülen und Mikroorganismen abdichten. DC gelangen mit ihren Fortsätzen bis in die seitlichen Zwischenräume der Epithelzellen. Sie kommen dort zusammen mit unmyelinisierten Nervenendigungen vor (Lambrecht et Hammad 2003). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie DC trotz der epithelialen tight junctions in Kontakt mit Allergenen kommen. Zum einen

können manche Allergene tight junctions spalten; bei Der p1, einem der Hauptallergene der Hausstaubmilbe, bewirkt beispielsweise ein Enzym das Aufbrechen des tight junction Proteins Occludin (Wan et al. 1999). Zum anderen können DC selbst tight junctions zu Epithelzellen ausbilden und somit den geschlossenen Verband der Epithelzellen zum Lumen hin durchbrechen. Dies wurde bisher jedoch nur an menschlichem Darmepithel in vitro gezeigt (Rescigno et al. 2001).

Außerdem können DC auch über Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin mit Epithelzellen verbunden sein. Da E-Cadherin besonders im Bereich geschädigten Epithels ausgebildet wird, könnten DC dort leicht Zugang zu Allergenen finden (Carayol et al. 2004).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül der Epithelzellen ist das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1). Bei Provokation des Epithels durch Allergene kommt es neben Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen aus den Epithelzellen auch zu einer verstärkten Ausbildung von ICAM-1. Dadurch kann die Rekrutierung DC in das betroffene Gebiet gefördert werden (Poynter et al. 2002; Stacey et al. 1997).

Eines der durch Epithelzellen gebildeten Zytokine ist der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), welcher auf DC wachstumsfördernd und aktivierend wirkt. Er wird von Epithelzellen nach Aktivierung des Rezeptors PAR-2 freigesetzt. Auf dem Epithel von Asthmatikern ist PAR-2 stärker exprimiert als bei Nichtasthmatikern (Knight et al. 2001). Die Rekrutierung von DC erfolgt binnen 4-5 h nach relevantem Allergenkontakt aus dem Pool der im Blutstrom zirkulierenden DC (Jahnsen et al. 2001). Neben GM-CSF sind noch weitere Zytokine sowie Neuropeptide und Komplementfaktoren bei der Anlockung von DC in die Atemwege involviert (Lambrecht 2001; McWilliam et al. 1996; Pichavant et al. 2002).

### 1.3.2 Antigenaufnahme

Allergene bzw. Antigene können auf verschiedene Arten in den Zelleib der DC gelangen. Bekannte Mechanismen sind Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose. Makropinozytose ist ein Aktin-abhängiger Prozess, bei dem es durch Invagination der Plasmamembran und Abschnürung von Vesikeln nach intrazellulär zur unselektiven Aufnahme gelöster Moleküle kommt (Watts 1997). Der Durchmesser der Vesikel beträgt 0,5-2 µm, während die Vesikel bei der Mikropinozytose lediglich 0,15 µm messen. Makropinozytose kommt bei unreifen DC im Vergleich zu anderen Zellen besonders häufig vor. Durch Makropinozytose kann circa ein Zellvolumen Flüssigkeit pro Stunde ins Zellinnere gelangen (Sallusto et al. 1995). Die aufgenommenen Antigene werden innerhalb der Zelle zur Prozessierung zu spezialisierten Kompartimenten transportiert, die unter anderem die MHC II-Proteine enthalten.

Phagozytose ist ein Prozess, bei dem Partikel, Mikroorganismen oder Bestandteile abgestorbener Zellen mit Hilfe spezifischer Rezeptoren ins Zellinnere aufgenommen werden. Phagozytose ist ebenfalls Aktin-vermittelt und ATP-abhängig sowie abhängig von der Anwesenheit GTP-bindender Proteine (Franc et al. 1999).

Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose binden Antigene an Rezeptoren und werden mittels Clathrin-ummantelter Vesikel ATP-abhängig in die Zelle geschleust. Im Unterschied zu Makropinozytose und Phagozytose sind für diesen Prozess keine Aktinfilamente erforderlich (Cox et al. 2000). Im Wesentlichen können zwei Typen von Endozytose-Rezeptoren auf DC unterschieden werden: Kalzium-abhängige Rezeptoren vom Lectin-Typ und Fc-Rezeptoren. Der bekannteste Rezeptor vom Lectintyp ist der Makrophagen-Mannose-Rezeptor; er wird sowohl von Makrophagen als auch von DC exprimiert (Stahl et Ezekowitz 1998). Durch ihn werden Antigene zu endosomalen Kompartimenten transportiert, worauf er selbst recycelt wird und wieder zur Plasmamembran gelangt. Im Gegensatz dazu wird der Fc-Rezeptor zusammen mit dem Antigen in Lysosomen degradiert. Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose wird die nachfolgende Prozessierung und Präsentation über MHC II-Moleküle nachweislich gefördert, die Effizienz der Präsentation löslicher Antigene wird auf das 100-1000fache gesteigert (Cella et al. 1999b). Nach Ausreifung humaner DC findet keine Antigenaufnahme mehr über den Mannose-Rezeptor statt, obwohl dieser weiterhin auf der Zelloberfläche nachweisbar ist (Dong et al. 1999).

### 1.3.3 Antigenprozessierung

Bei der Prozessierung werden in die Zelle aufgenommene Antigene zerlegt und wesentliche antigene Bestandteile an MHC-Moleküle gebunden. Diese Verbindungen werden dann auf der Zelloberfläche exprimiert, was der Stimulation von T-Zellen dient.

In antigenpräsentierenden Zellen befinden sich die meisten MHC II-Moleküle in späten endozytotischen Strukturen, die aus einer Vielzahl einzelner Membranhüllter Vesikel bestehen und als M II-Kompartimente (MHC-Klasse II-Kompartimente) bezeichnet werden. Reife MHC II-Moleküle sind außerdem in frühen Endosomen enthalten. Sie kommen von der Zelloberfläche und werden wieder recycelt (Harding et Unanue 1989; Reid et Watts 1990). M II-Kompartimente enthalten neusynthetisierte MHC II-Moleküle, die an eine invariant chain gekoppelt dorthin transportiert werden. Die invariant chain wird im endoplasmatischen Retikulum an die Klasse-II-Untereinheiten angelagert. In den M II-Kompartimenten wird ein Teil der invariant chain proteolytisch durch Cathepsin B, D und S abgespalten (Driessen et al. 1999). Der verbleibende Teil der Kette wird als CLIP bezeichnet (Riberdy et al. 1992). CLIP wird durch HLA-DM-Moleküle entfernt (Lanzavecchia 1996), wodurch Klasse-II-Dimere entstehen, die Peptide bzw. Antigene binden können (Amigorena et al. 1995). Nach Antigenbindung werden diese Komplexe zur Plasmamembran transportiert. Beim Recycling der MHC-Moleküle können diese neben frühen Endosomen auch wieder in M II-Kompartimente gelangen. Dieses Recycling lässt sich bei unreifen DC häufig beobachten, während es bei reifen DC kaum noch vorkommt (Cella et al. 1997). Wenn es auf Grund inflammatorischer Stimuli zur Ausreifung von DC kommt, werden die MHC-II-Proteine zusammen mit kostimulierenden Molekülen in spezialisierten Vesikeln zur Plasmamembran transportiert, wo sie für gewisse Zeit in Gruppen verbleiben (Turley et al. 2000). MHC-Moleküle auf der Oberfläche reifer DC, die nicht am Recycling teilnehmen, haben eine Halbwertszeit von circa 100 Stunden, was insofern sinnvoll erscheint, als die DC zur Antigenpräsentation von der Peripherie in die sekundären lymphatischen Organe wandern.

Neben der beschriebenen intrazellulären Bindung von Peptiden an MHC II-Moleküle können Antigene auch an MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche binden (Arndt et al. 2000; Santambrogio et al. 1999b). Unbesetzte Klasse-II-Dimere werden ausschließlich auf der Oberfläche unreifer DC gefunden, so dass man davon

ausgehen muss, dass während der Migration von DC zu den Lymphknoten keine Antigenbindung auf der Zelloberfläche stattfindet (Santambrogio et al. 1999a).

#### **1.3.4 Migration**

DC können wie alle Leukozyten über den Blutstrom per Diapedese zu bestimmten anatomischen Strukturen gelangen. Die gezielte Migration von DC wurde erstmalig im Rahmen von Untersuchungen zur Kontaktallergie bemerkt (Lens et al. 1983). Für die Induktion der zellulären Immunität ist es entscheidend, dass (Silberberg-Sinakin et al. 1976) DC mit dem entsprechenden Antigen beladen via Lymphgefäße aus dem peripheren Gewebe zu den drainierenden lymphatischen Organen wandern (Cyster 1999). Diese Migration muss gegen den chemotaktischen Gradienten erfolgen, durch den unreife DC zu den peripheren Geweben gelangen. Als Teil des Reifungsprogramms, das nach Antigenbeladung stattfindet, wird die Expression von chemokine receptor (CCR7) und CXCR4 hochreguliert. Dies erklärt, weshalb die reifenden DC zur T-Zellregion der drainierenden Lymphknoten finden, wo die Liganden dieser Rezeptoren exprimiert werden (Cyster 1999; Dieu et al. 1998). Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass CCR7 für den Übertritt von Langerhans Zellen (LC) aus der Haut in die lymphatischen Gefäße, die Wanderung zu den regionalen Lymphknoten und die Generation einer Kontakthypersensibilität sowie einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ notwendig ist (Engeman et al. 2000; Forster et al. 1999; Saeki et al. 1999). Cumberbatch zeigte, dass intradermale Injektion von Interleukin 1 (IL-1) und Tumor-Nekrosefaktor (TNF) eine Abnahme von LC in der Epidermis und eine Zunahme von DC in den drainierenden Lymphknoten zur Folge hat (Cumberbatch et al. 1997). Roake et al. haben ebenfalls gesehen, dass DC als Reaktion auf IL-1 und TNF aus Niere und Herz abwandern (Roake et al. 1995; Sozzani et al. 1998). Ein weiteres multifunktionelles Molekül, das bei der Migration von DC eine Rolle spielt, ist CD44 und seine diversen Isoformen. Bei der Wanderung zu regionalen Lymphknoten wird die Anzahl von CD44-Epitopen hochreguliert und bestimmte Isoformen werden exprimiert (Weiss et al. 1997). Die Wanderung von DC aus der Peripherie zu den regionalen Lymphknoten findet nicht nur bei Entzündungsreaktionen, sondern auch im gesunden Organismus statt (Vermaelen et al. 2001; Xia et al. 1995). DC sind auch zur Migration mit dem Blutstrom in entgegengesetzter Richtung, von extra- nach intraluminal, in der Lage. Wie diese Migration im Detail gesteuert wird, ist bisher noch ungeklärt. In-vitro-Untersuchungen an einer Schicht aus menschlichen

vaskulären Endothelzellen weisen auf eine Beteiligung von CD31 beim Durchdringen des Endothels von extra- nach intraluminal hin (D'Amico et al. 1998). Studien mit CD14+CD34+ DC-Vorläufern haben gezeigt, dass sowohl der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor als auch macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) bei der reversen transendothelialen Migration involviert sind (Ferrero et al. 2000). Durch die Reifung der DC geht die Fähigkeit, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren, verloren.

### **1.3.5 Antigenpräsentation**

Nach Erreichen der T-Zellregion der drainierenden Lymphknoten sind DC auf die Stimulation naiver T-Zellen spezialisiert. Sie produzieren die Chemokine MIP-3 $\beta$  und DCC-1 für naive T-Zellen sowie Chemokine für ruhende Gedächtniszellen (Cyster 1999). Naive T-Zellen nehmen mit den Antigen-tragenden DC wiederholt Kontakt über Adhäsionsmoleküle wie dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin (DC-SIGN) und CD54 (mit interzellulärem Adhäsionsmolekül 3 und CD11a/CD18) auf (Geijtenbeek et al. 2000; Gunzer et al. 2000). Diese unspezifischen Interaktionen ermöglichen auch ein Erkennen spezieller Peptid-MHC-Verbindungen über den low affinity T-Zellrezeptor (Lanzavecchia et Sallusto 2000). Während ihres Reifungsprozesses exprimieren DC kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD28 (Cella et al. 1997; Turley et al. 2000). Die Bindung von DC über den Peptid-MHC Komplex und CD28 an T-Zellen, eine Art immunologischer Synapse, ist ein sich selbst verstärkender Prozess (Wulfing et Davis 1998). Auf diese Weise aktivierte T-Zellen exprimieren CD40L und TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), was zu einem längeren Überleben und einer kompletten Ausreifung von DC führt. Die DC exprimieren dann vermehrt CD80, CD86 und Zytokine, wodurch die Interaktion mit den T-Zellen weiter gefördert wird (Banchereau et al. 2000). Das Endergebnis dieser Kaskade ist eine schnelle Teilung der T-Zellen. Es konnte beobachtet werden, dass diese Teilung in vivo bereits zwei Tage nach Injektion Antigen-beladener DC zweifach stattgefunden hat. Weitere 24-48 h später haben sich diese T-Zellen bereits zu Effektorzellen differenziert und wandern von den Lymphknoten in die Peripherie (Lambrecht et al. 2000). Wie die Differenzierung der T-Zellen zu T1- oder T2-Helferzellen im Detail gesteuert wird, ist bis heute nicht geklärt. Mikrobenbestandteile induzieren überwiegend eine Th1-Antwort, indem sie eine verstärkte Produktion von IL-12 in DC bewirken (Hilkens et al. 1997). Hier spielen jedoch auch wirtspezifische

Faktoren eine Rolle; nur in Anwesenheit von Interferon  $\gamma$  oder IL-4 wird durch mikrobielle Produkte eine kontinuierliche Produktion von IL-12 in DC induziert (Vieira et al. 2000). Früher glaubte man, dass beim Menschen aus Monozyten entstandene myeloide DC eine IL-12-abhängige Th1-Anwort induzieren, während lymphoide DC mit plasmazytoiden Vorläufern vorrangig eine Th2-Antwort hervorrufen (Cella et al. 1999a; Rissoan et al. 1999). Bei Experimenten mit Mäusen hingegen finden sich Hinweise für den umgekehrten Zusammenhang (myeloide DC induzieren Th2) (Moser et Murphy 2000). Es wurde jedoch für den Menschen gezeigt, dass sich myeloide DC in CD1a<sup>+</sup> und CD1a<sup>-</sup> unterteilen lassen, die entsprechend Th1 bzw. Th2-Antworten induzieren (Chang et al. 2000). Zusammenfassend lässt sich also nicht einfach von der Herkunft DC auf ihre Wirkung bezüglich der T-Zelldifferenzierung zu T1- oder T2-Helferzellen schließen. DC sind nicht nur für die Sensibilisierung gegenüber Allergenen verantwortlich, sondern auch für den Erhalt einer eosinophilen Atemwegsentszündung. Verschiedene Tiermodelle haben gezeigt, dass DC nach Ovalbuminsensibilisierung aus dem Knochenmark und dem Blutstrom in das periphere Entzündungsgebiet wandern und dort die eosinophile Entzündungsreaktion und die IgE-Synthese aufrecht erhalten (Lambrecht et al. 1998; 1999; McWilliam et al. 1996).

Unser westlicher Lebensstil geht mit einer Reduktion der mikrobiellen Belastung einher. Dadurch werden DC weniger zur Produktion von IL-12 stimuliert, was einer Ausprägung der Th2-Antwort und damit einer Allergieentwicklung entgegengewirkt könnte (Holt et al. 1999). Dies kann die Beobachtung erklären, dass allergisches Asthma in ökonomisch besser gestellten Ländern häufiger auftritt. Eine erhöhte Zahl CD1a<sup>+</sup> DC konnte in der Nasenschleimhaut von Patienten mit atopischer Rhinitis, in Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis und im Bronchialepithel von Asthmatikern gefunden werden (Holm et al. 1995; Moller et al. 1996; Wollenberg et al. 1995).

Bei in vitro Untersuchungen zur Funktion von DC bei Patienten mit und ohne atopischer Erkrankung zeigte sich, dass unreife myeloide DC von Individuen mit allergischem Asthma erhöhte allostimulatorische Funktionen zeigen und mehr CD11b und HLA-DR exprimieren als nicht-atopische Patienten, wobei andere Autoren diesen Ergebnissen widersprechen (Bellinghausen et al. 2000; van den Heuvel et al. 1998).

## **1.4 Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem**

### **1.4.1 Neuronale Einflüsse auf Zellen des Immunsystems**

Aus Nervenendigungen freigesetzte Peptide aus der Familie der Tachykinine haben Wirkungen auf verschiedene Zellen des Immunsystems. SP bewirkt eine Degranulation von Mastzellen (Foreman et al. 1983; Landry et al. 1990). Monozyten werden durch SP per Chemotaxis angezogen (Iwamoto et al. 1990), wobei ihre metabolische Aktivität (Hartung et al. 1986; Iwamoto et al. 1990) und Phagozytoseaktivität gesteigert werden (McGillis et al. 1987). Bei eosinophilen Granulozyten bewirkt SP eine erhöhte Expression von Fc-Rezeptoren, sowie eine Steigerung der Antikörper-abhängigen Zytotoxizität (DeSimone et al. 1987), bei Lymphozyten eine Steigerung der Mitose (Payan 1983), sowie der Immunglobulinproduktion in Plasmazellen (Hart et al. 1990; Stanisiz et al. 1986). Das Neuropeptid CGRP, das aus den sensiblen Nervenendigungen in der Peripherie freigesetzt wird, wirkt auf DC chemotaktisch (Dunzendorfer et al. 2001). Zudem verhindert CGRP ein Abwandern reifer DC Richtung regionärer Lymphknoten (Dunzendorfer et al. 2001). Bei LC der Epidermis der Maus konnten für CGRP inhibitorische Effekte auf Antigenpräsentation und Stimulation spezifischer T-Zellen gezeigt werden (Hosoi et al. 1993). Zudem unterdrückt CGRP die Produktion des Zytokins IL-10 in LC (Torii et al. 1997). IL-10 supprimiert die Th1-vermittelte Immunität durch Unterdrückung der Antigenpräsentation an Th1-Zellen (Enk et al. 1993).

### **1.4.2 Immunologische Einflüsse auf Zellen des Nervensystems**

Untersuchungen an isolierten Bronchien von Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen haben ergeben, dass Mastzellen, die sich in den parasympathischen intramuralen Ganglien befinden, nach Antigen-Provokation degranulieren und parallel dazu elektrophysiologische Veränderungen bezüglich der synaptischen Übertragung in den entsprechenden Neuronen auftreten (Myers et al. 1991). Durch die Mastzelldegranulation wird im Wesentlichen eine Steigerung der Effizienz der synaptischen Übertragung bewirkt (Undem et al. 1991). Unter anderem wird der präganglionäre Input weniger stark gefiltert (Mitchell et al. 1987), und dadurch die parasympathische Wirkung verstärkt. Wahrscheinlich werden diese

Effekte durch Mastzellmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Prostaglandin D<sub>2</sub> verursacht (Myers et al. 1991; Myers et Undem 1995).

Im Zentralnervensystem gesunder Ratten kommen in der Regel keine antigenpräsentierenden Zellen vor (Aloisi et al. 2000; Perry et Lawson 1992). Dies wird hier durch eine intakte Blut-Hirnschranke verhindert, die im peripheren Nervensystem nur diskontinuierlich ausgebildet ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 12 spezifisch pathogenfreie Meerschweinchen (HsdPoc) der Firma Harlan-Winkelmann (Kassel).

Die Tiere wogen zu Beginn der Versuche 250-300 g, bei Tötung 600-700 g. Als Futter wurden Altromin, ein standardisiertes Haltungsfutter in Form von Presslingen, (Firma Frey, Lollar), Heu und Leitungswasser verwendet. Die Tiere wurden 12 h unter elektrischer Beleuchtung und 12 h in Dunkelheit gehalten.

#### 2.1.2 Primärantikörper

Die folgende Tabelle zeigt die im Experiment verwendeten Primärantikörper:

Antigen	Antikörper	Wirtsspezies	Verdünnung	Hersteller
Histokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II (Ia-Region) des Meerschweinchens	Klon Msgp 8 IgG monoklonal	Maus	1:10	zur Verfügung gestellt von D. Baker, London, GB
protein-gene-product 9.5 (PGP 9.5)	polyklonales Serum	Kaninchen	1:2000	UltraClone, Isle of Wight GB

**Tabelle 1:** Primärantikörper

#### 2.1.3 Sekundärantikörper

Die folgende Tabelle zeigt die im Versuch verwendeten Sekundärantikörper:

Antigen	Konjugat	Wirtspezies	Verdünnung	Hersteller
Maus-IgG	Biotin	Schaf	1:100	Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland
Kaninchen-IgG	Floureszein-isothiocyanat	Ziege	1:500	Firma Organon Teknika Corporation, Eppelheim, Deutschland

**Tabelle 2:** Sekundärantikörper

### 2.1.4 Tertiärreagenz

Die folgende Tabelle zeigt das im Versuch verwendete Tertiärreagenz:

Reagenz	Verdünnung	Hersteller
Streptavidin-Texas-Rot	1:200	Firma Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland

**Tabelle 3:** Tertiärreagenz

### 2.1.5 Reagenzien und Zusammensetzungen der Lösungen

Alle Reagenzien ohne Angabe des Firmennamens stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

#### Allergisierungslösung

Zur Herstellung der Injektionslösung wurden 200 mg  $\text{Al}(\text{OH})_3$  mit 20  $\mu\text{g}$  Ovalbumin (Huhn) ad 1 ml 0,9% NaCl für 1 h verrührt.

#### Chloroformgas

Trichlormethan (Firma Riedel-de-Haen, Seelze)

#### Zamboni Fixativ

50 ml Formalinlösung (37%)

500 ml 0,2 M Phosphatpuffer

150 ml Pikrinsäure (gesättigte Lösung, zweifach gefiltert)

ad 1000 ml    Aqua dest.

### Gefrierschutz

18% Saccharose in 0,1 M Phosphatpuffer

Flüssiger Stickstoff (-173°C)

### Tissue Tek

Einbettungsmedium der Firma Vogel, Giessen

### Chromgelatine-beschichtete Objektträger

Zur Beschichtung der Objektträger wurde 1 l Aqua dest. mit 5 g Gelatine auf 35°C erwärmt, dann wurden 0,5 g Chromalaun hinzugefügt und weiter auf 40°C erwärmt. Nach Abkühlen auf 20°C wurden autoklavierte Objektträger für 10 min in die Lösung eingetaucht und über Nacht im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

### Blocklösung

10% normales Schweineserum (Schlachthof, Giessen), 0,5% Tween 20 (Firma Sigma, Deisenhofen), 0,1% Rinderserumalbumin (Firma Sigma, Deisenhofen) in phosphatgepuffelter Salzlösung

### Phosphatpuffer (PP) 0,2 M

Lösung A    0,2 M Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )    31,2 g/l

Lösung B    0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )    35,6 g/l

Zur Herstellung des Phosphatpuffers mischt man 230 ml der Lösung A mit 770 ml der Lösung B und stellt den pH-Wert auf 7,4 ein.

### Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) / PBS mit doppeltem Salzgehalt

28,75 ml    Lösung A

96,2 ml    Lösung B

22,4 g    Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )    /44,8 g (doppelter  $\text{NaCl}$ -Gehalt)

ad 5000 ml    Aqua dest.

### Hämalaun

1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat ( $\text{NaJO}_3$ ) und 50 g Kalialaun ( $\text{K}_2\text{SO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) in 1 l Aqua dest. gelöst.

### DAPI

Kristallisiertes 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid löst man mit  $0,1\mu\text{g/ml}$  in PBS.

### Gepuffertes Glycerol

Für die Pufferlösung stellt man 50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) mit 0,5 M Dinatriumcarbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) auf pH 8,6 ein. Ein Teil dieses Puffers wird mit zwei Teilen Glycerol gemischt.

## 2.1.6 Geräte

Für Versuche und Auswertung wurden folgende Geräte verwendet:

Exsikkator	Firma Heraeus, Hanau, Deutschland
Kryostat	Jung Frigocut 2800 E der Firma Leica, Bensheim, Deutschland
Foto-Fluoreszenzmikroskop	BX60F der Firma Olympus, Hamburg, Deutschland
Computer	Firma Peacock
Scion Image	Software der Firma Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA
Objektmikrometer	2 mm-Skala, 1 Intervall = 0,01mm, Firma Leitz, Wetzlar, Deutschland

**Tabelle 4:** Geräte

## 2.1.7 Filmmaterial

Schwarz-Weiß-Film TMY 400 der Firma Kodak

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchsgruppen**

Die Meerschweinchen wurden nach dem Zufallsprinzip in die folgenden drei Versuchsgruppen zu je vier Tieren eingeteilt:

1. intraperitoneale Ovalbumin-Injektion (Sensibilisierung) und inhalative Ovalbumin-Exposition (Provokation)
2. intraperitoneale Vehikelinjektion und Provokation
3. Sensibilisierung und inhalative Vehikelexposition

### **2.2.2 Allergisierungsschema**

Zur Sensibilisierung wurde den Meerschweinchen dreimal intraperitoneal jeweils 15 ml verdünntes Ovalbumin (20 µg/ml in 0,9% NaCl) über 15-30 Sekunden injiziert. Die Injektionen erfolgten im Abstand von jeweils zwei Wochen. Den Tieren der Versuchsgruppe 2 wurde anstelle von Ovalbumin Vehikel (200 mg Al(OH)<sub>3</sub>) verabreicht.

Eine Woche nach der letzten Injektion folgte die Allergenprovokation der Meerschweinchen der Versuchsgruppen 1 und 2 durch inhalative Ovalbumin-Exposition mit Vernebelung von 2x 15 ml Ovalbuminlösung (0,1 g Ovalbumin in 100 ml 0,9% NaCl) über jeweils 15-30 min. Die Tiere der Versuchsgruppe 3 inhalierten 0,9% NaCl in derselben Dosierung. Nach 24 h erfolgten Tötung und Gewebeentnahme.

### **2.2.3 Tierpräparation**

Die Tötung der Tiere erfolgte in Chloroformgas.

Zuerst wurden ein medianer Bauch- und Thoraxschnitt durchgeführt und dann die Baucharterie durchtrennt. Nach Anlegen einer Ligatur an die Trachea circa 0,5 cm kranial der Trachealbifurkation wurde wenig caudal von dieser Stelle die Trachea punktiert und Zambonifixans in das Bronchialsystem injiziert, bis es zu einem Farbumschlag im Bereich der distalen Lungenabschnitte von rosa nach gelb kam. Es folgte die Herausnahme der intrathorakalen Organe.

Anschließend wurde der Schädel dorsal aufgebrochen und beidseits das Felsenbein entfernt. So ließ sich im Foramen jugulare das Ganglion jugulare darstellen. Direkt unterhalb des Ganglion jugulare befindet sich das Ganglion nodosum. Die Ganglia nodosa wurden beidseits freipräpariert und entnommen.

#### **2.2.4 Gewebebehandlung**

Die Gewebe wurden 4-6 h in Zamboni fixiert und anschließend 3-4 mal mindestens 1 h und einmal über Nacht in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Der Waschvorgang wurde nochmals wiederholt, falls die Pufferlösung noch gelblich verfärbt war. Zur Kryoprotektion wurden die Gewebe danach für zwei Tage in einem 18% saccharosehaltigen 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) belassen. Der Puffer wurde währenddessen mehrmals täglich gewechselt. Anschließend wurden die Gewebe in Tissue-Tek eingebettet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.2.5 Anfertigung der Gewebeschnitte**

Es wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten Gewebeschnitte von 10  $\mu\text{m}$  Dicke angefertigt und auf mit Chromgelatine beschichtete Objektträger aufgebracht. Für die Untersuchungen an der Bronchialschleimhaut wurde das Lungengewebe längs der Hauptbronchien geschnitten. Im Bereich der Trachealbifurkation wurden Querschnitte angefertigt und lichtmikroskopisch nach Färbung mit Hämalaun diejenigen ausgewählt, die Bronchialganglien enthielten. Die übrigen Schnitte wurden verworfen. Da die intramuralen Ganglien der Trachealbifurkation zumeist aus nur wenigen Nervenzellen bestehen, wurden auch Schnitte mit lediglich einem Neuron mit angeschnittenem Zelleib und Zellkern ausgewertet. Die Ganglia nodosa wurden ebenfalls zu 10  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten verarbeitet, wobei die Bereiche mit dem größten Querschnitt für die Inkubation verwendet wurden.

#### **2.2.6 Immunhistochemie**

Die Gefrierschnitte wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für eine Stunde mit einer Lösung zum Blocken unspezifischer Bindungen inkubiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden hierbei mit einer Lösung aus 10% normalem Schweineserum (NSS) und 0,5% Tween 20 in 0,1% Phosphatpuffer mit doppeltem Salzgehalt abgesättigt.

Nachfolgend wurde der Primärantikörper Msgp8 in einer Verdünnung von 1:10 aufgebracht. Dieser monoklonale Antikörper aus der Maus ist gegen den major histocompatibility complex II des Meerschweinchens gerichtet.

Zur Darstellung der Neurone wurde zusätzlich ein polyklonales Antiserum aus dem Kaninchen gegen PGP 9.5 in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Zur Verdünnung wurde jeweils Phosphatpuffer mit doppelter Salzkonzentration benutzt,

da der hohe Salzgehalt unerwünschte Hintergrundreaktionen verringert (Grube 1980).

Die gleichzeitige Anwendung zweier Primärantikörper bezeichnet man als Doppelimmunfluoreszenz. Dieses Vorgehen wurde bei allen untersuchten Geweben, auch bei der Inkubation der Bronchuslängsschnitte, angewandt, um einen Eindruck von der topographischen Beziehung der DC zu den Nervenfasern in der Atemwegsschleimhaut zu erhalten.

Zur Kontrolle der Spezifität wurde der Primärantikörper durch ein Non-Immuneserum oder durch PBS ersetzt.

Die Schnitte wurden über Nacht - mindestens 12 Stunden - bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger zwei Mal fünf Minuten in PBS gespült.

Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen wurde mit einem biotinierten Anti-Maus-IgG Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 und einem FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen Antiserum - Verdünnung 1:50 - eine Stunde lang inkubiert. Es erfolgten wiederum zwei Spülvorgänge in gleicher Weise wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper.

In einem weiteren Schritt wurden die gebundenen biotinierten Anti-Maus-Immunglobuline mit Streptavidin-Texas-Rot, einem Fluoreszenzfarbstoffkomplex, markiert. Die Inkubationsdauer betrug ebenfalls eine Stunde. Da Streptavidin eine hohe Affinität zu Biotin besitzt, gilt es als empfindliches Nachweissystem (Bonnard et al. 1984). Das Streptavidinkonjugat wurde 1:200 mit PBS verdünnt. Es folgten zwei weitere Spülvorgänge.

Zur Kerndarstellung wurde für 10 min mit 4-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), 0,1 µg/ml in PBS, inkubiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet selektiv an Adenin-Thymin-reiche DNS verschiedener Herkunft und bildet blau fluoreszierende DNS-DAPI Komplexe (Grossgebauer et al. 1976).

Abschließend wurden zwei Spülvorgänge durchgeführt und die Gewebeschnitte in gepuffertem Glycerol mit einem pH-Wert von 8,6 eingebettet. Glycerol dient zum einen der Konservierung und zum anderen der Erhöhung der Lichtdurchlässigkeit des Gewebes.

### 2.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei macht man sich die Eigenschaft verschiedener Fluorochrome zu Nutze, nach Anregung durch kurzwelliges oder ultraviolettes Licht Strahlung längerer Wellenlänge zu emittieren. Zur Selektion dieser Strahlung verwendet man Sperrfilter, wodurch sich die interessierenden Fluoreszenz-markierten Strukturen als leuchtende Objekte auf schwarzem Hintergrund darstellen.

Als Lichtquelle dient eine Quecksilberdampfcurzbogenlampe.

Die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe macht den Einsatz von Erreger- und Sperrfiltern unterschiedlicher Wellenlänge erforderlich (siehe Tabelle5).

Filterkombination	Fluorochrom	Erregerfilter	Sperrfilter
U-MWIY	Texas-Rot	band pass 545-580 nm	long pass 610 nm
U-MNIB	FITC	band pass 470-490 nm	band pass 515-550 nm
U-MNUA	DAPI	band pass 360-370 nm	band pass 420-460 nm

**Tabelle 5:** verwendete Erreger-und Sperrfilter

### 2.2.8 Fotodokumentation

Die Versuche wurden mittels Schwarz-Weiß-Fotos dokumentiert.

Hierzu wurden ein an das Mikroskop angeschlossener Fotoapparat und ein Fotomikrographik-System mit einer 40-fachen Objektivvergrößerung verwendet.

### 2.2.9 Auswertung

Kriterien

Quantifiziert wurden alle MHC II-positiven Zellen, die im Schnittprofil einen Zellkern, einen Zelleib und mindestens einen „dendritischen“ Zellfortsatz besaßen.

Als Neurone wurden alle PGP 9.5-positiven Zellen identifiziert, bei denen sowohl ein Zelleib als auch ein Zellkern angeschnitten waren.

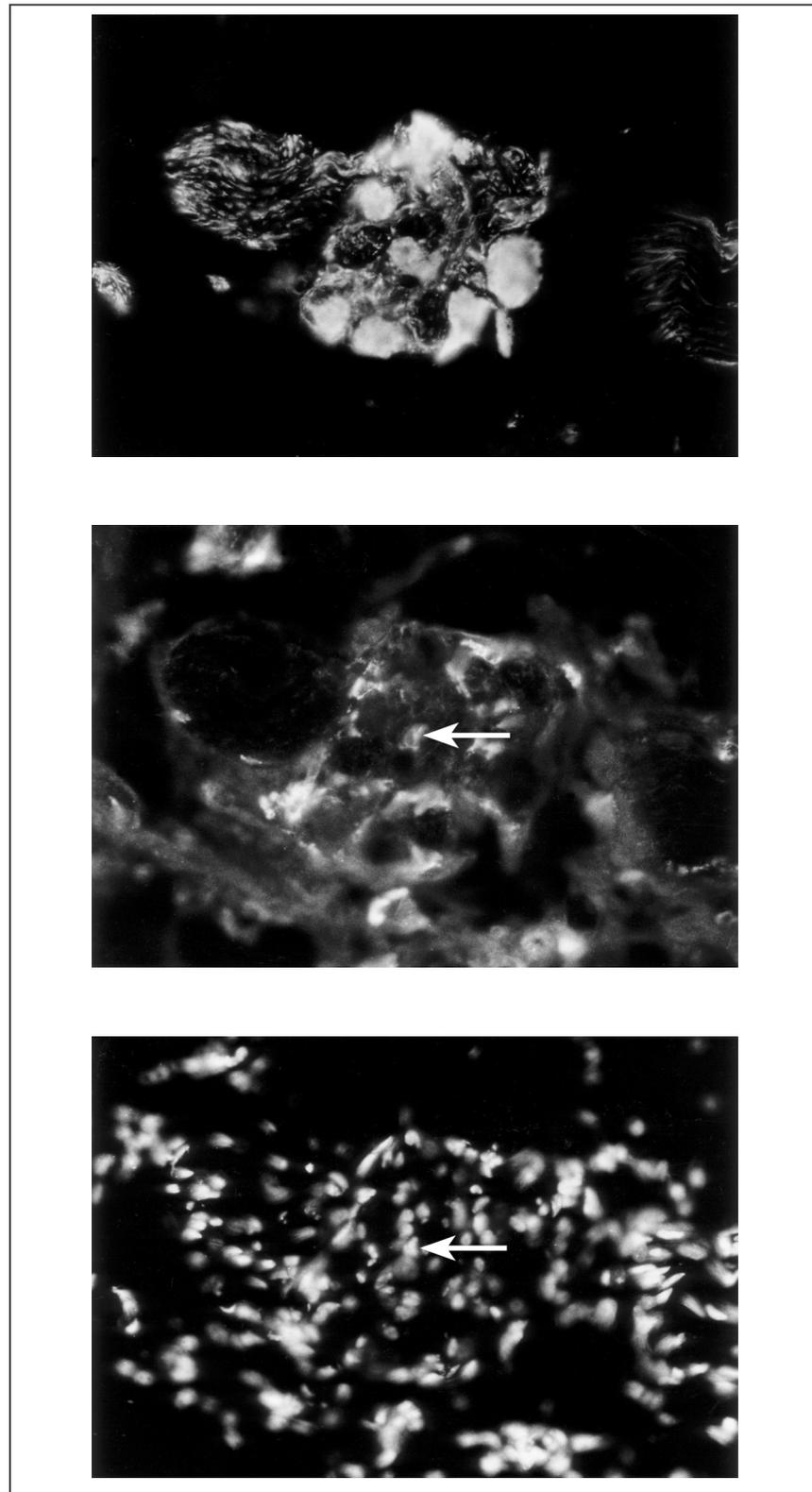
In den intramuralen Ganglien der Trachealbifurkation und in den Ganglia nodosa wurden die oben beschriebenen MHC II-positiven Zellen quantifiziert, die in direktem Kontakt zu Neuronen standen. Als direkter Kontakt wurde ein vom Betrachter optisch wahrgenommener Berührungspunkt bei einer Vergrößerung von 1:400 definiert.

### Auswertung am Mikroskop

In der Lamina propria der Bronchialschleimhaut wurden die oben definierten MHC II-positiven Zellen mit Hilfe eines Rasters pro Flächeneinheit quantifiziert. Dazu wurde die Längskante des Rasters optisch an die Basalmembran angelegt, um ein möglichst einheitliches Vorgehen bei allen Schnitten der Bronchialschleimhaut zu erreichen.

In den intramuralen Ganglien der Trachealbifurkation und in den Ganglia nodosa wurden die Anzahl der MHC II-positiven Zellen mit angeschnittenem Zellkern, Zelleib und „dendritischem“ Fortsatz sowie die Anzahl der mit ihnen in räumlichem Kontakt stehenden Neuronen eines Ganglienanschnittes computerassistent mit Hilfe des Programmes Scion Image (siehe Tabelle 4) ermittelt, um eine Aussage über die Zahl dieser Zellen pro Neuron machen zu können.

Abbildung 1 zeigt beispielhaft die fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines intramuralen Ganglienanschnitts. In Abbildung 1a kommen die Neurone zur Darstellung, in Abbildung 1b die DC und in Abbildung 1c die entsprechenden Zellkernanschnitte.



**Abb. 1 a/b/c:** Darstellung eines intramuralen Ganglienanschnittes  
a: Markierung der Neurone (PGP 9.5)  
b: Markierung der DC (Msgp 8)  
c: Kerndarstellung (DAPI)

## Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden der Kruskal-Wallis-Test und für die post hoc-Analyse der Mann-Whitney Test verwendet.

Der Mann-Whitney Rangtest (Synonym: *U*-Test) baut auf den Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben auf und ist im Gegensatz zum *t*-Test für den Vergleich zweier Erwartungswerte stetiger Verteilungen verteilungsunabhängig. Als Voraussetzung für den *U*-Test müssen jedoch zwei unabhängige Zufallstichproben von Messwerten oder Rangdaten aus Grundgesamtheiten mit ähnlicher bis gleicher Verteilungsform vorliegen. Dies kann für diese Studie angenommen werden. Der *U*-Test geht davon aus, dass die  $n = n_1 + n_2$  Beobachtungen der Größe nach angeordnet und von 1 bis  $n$  durchnummeriert werden. Ergeben sich für die eine Stichprobe im Durchschnitt kleinere Werte als für die andere Stichprobe, unterscheiden sich die Rangsummen beider Stichproben.

Da in dieser Untersuchung mehr als zwei unabhängige Stichproben miteinander verglichen wurden, musste auch der *H*-Test von Kruskal und Wallis (1952) angewendet werden. Dieser Test ist eine Verallgemeinerung des *U*-Tests. Er prüft die Nullhypothese - die Stichproben entstammen derselben Grundgesamtheit - bei mehr als zwei Stichproben.

Die statistische Auswertung wurde computerassistent mit Hilfe des SPSS-Programmes durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bronchialschleimhaut

Es wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte der Hauptbronchien von jeweils vier spezifisch pathogenfreien Meerschweinchen (HsdPoc) pro Versuchsgruppe ausgewertet.

Pro Tier wurden zwei Schnitte ausgewählt, bei denen der Hauptbronchus möglichst längs angeschnitten war und 15 Gesichtsfelder Lamina propria Platz fanden. Ein Gesichtsfeld entsprach 1,25 mm<sup>2</sup> (40-fache Vergrößerung).

Die MHC II-positiven Zellen befanden sich überwiegend direkt unterhalb der Basalmembran oder zwischen zwei Muskelfaserbündeln. In diesen Bereichen kamen auch rundliche fluoreszenzmarkierte Zellen, vermutlich Makrophagen, zur Darstellung, die sich durch ihre Morphologie von dem gesuchten Zelltyp differenzieren ließen. Die Immunreaktivität war nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt, sondern im Bereich der dendritischen Fortsätze deutlich stärker ausgeprägt.

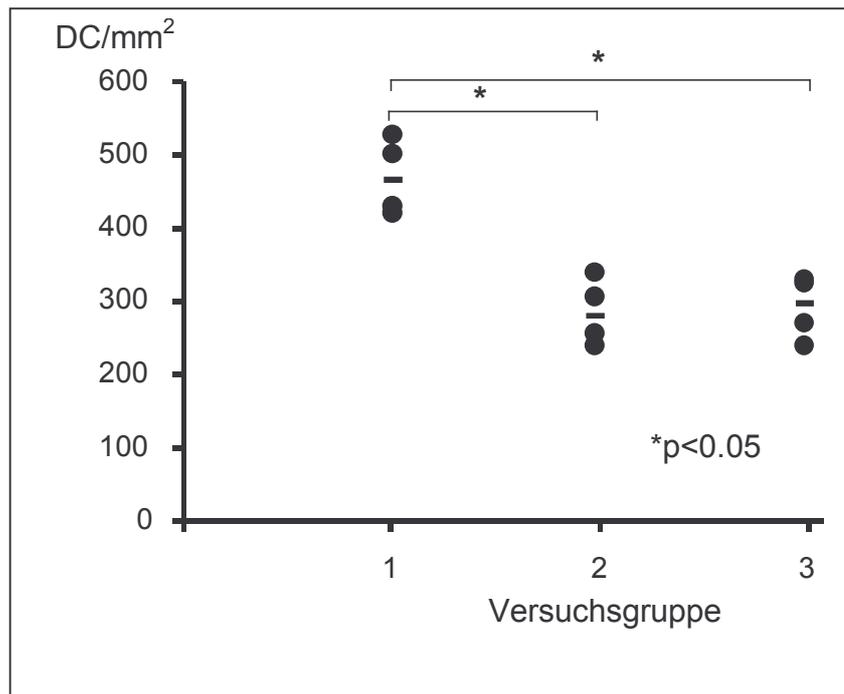
Im Flimmerepithel ließen sich die MHC II-positiven Zellen nicht eindeutig identifizieren, da die Epithelzellen besonders nach Sensibilisierung und Allergenprovokation selbst MHC II exprimieren und dadurch auch von Mspg 8 markiert wurden. Deshalb wurde hier keine Quantifizierung der MHC II-positiven Zellen durchgeführt.

In Versuchsgruppe 1, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition, fanden sich 467 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro mm<sup>2</sup> Lamina propria (Median; Minimum: 421, Maximum: 528).

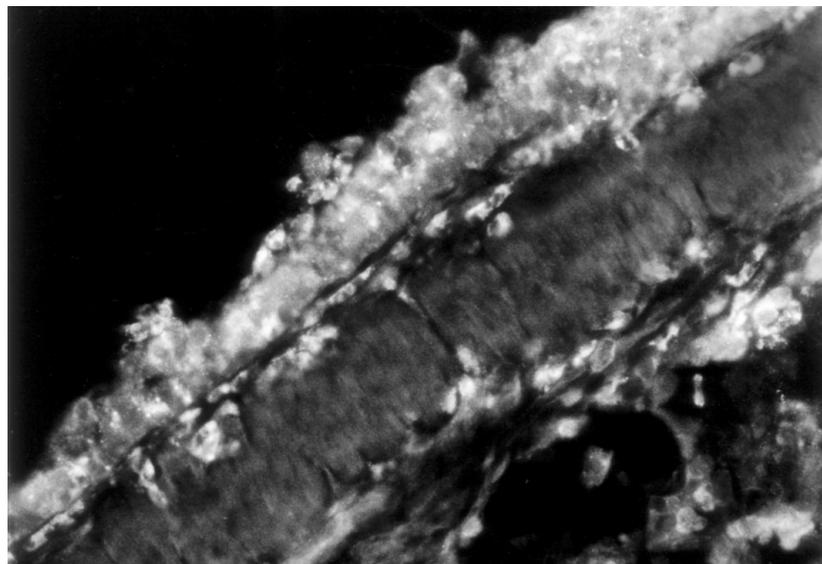
In Versuchsgruppe 2, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung, fanden sich in der Lamina propria 281 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro mm<sup>2</sup> (Median; Minimum: 240, Maximum: 341).

In Versuchsgruppe 3, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion ohne nachfolgende inhalative Allergenprovokation, betrug die Zahl der MHC II-positiven Zellen mit dendritischem Zellfortsatz 299 pro mm<sup>2</sup> (Median; Minimum: 240, Maximum: 331).

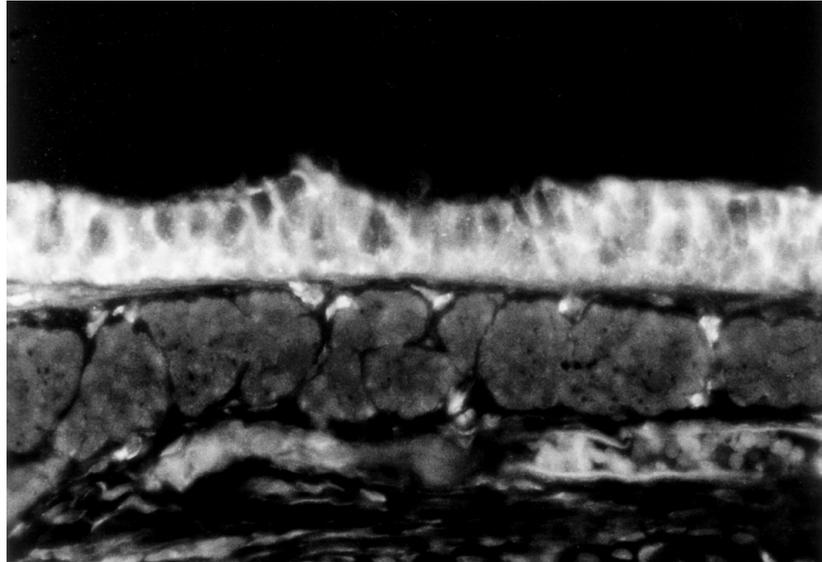
Somit fand sich in der Bronchialschleimhaut in Gruppe 1 ein signifikant ( $p < 0,05$ ) höherer Wert als in Gruppe 2 und in Gruppe 3. In Abbildung 2 ist die Quantifizierung DC in der Bronchialschleimhaut dargestellt. Die Abbildungen 3-5 zeigen fluoreszenzmikroskopische Darstellungen von DC in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut der Versuchsgruppen 1-3 (1 cm entspricht 20 µm).



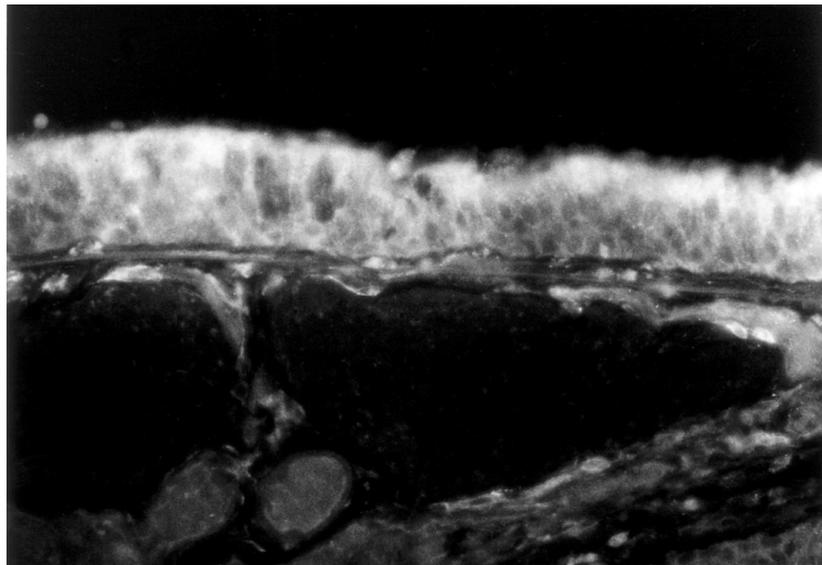
**Abb. 2:** Quantifizierung DC in der Bronchialschleimhaut



**Abb. 3:** DC in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut, Versuchsgruppe 1 (Sensibilisierung und inhalative Provokation)



**Abb. 4:** DC in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut, Versuchsgruppe 2 (inhalative Provokation)



**Abb. 5:** DC in der Lamina propria der Bronchialschleimhaut, Versuchsgruppe 3 (Sensibilisierung)

### 3.2 Lokale Atemwegsganglien

Da die lokalen Atemwegsganglien im Bereich der Trachealbifurkation des Meerschweinchens sehr klein sind und nur aus wenigen Ganglienzellen bestehen, mussten die Trachealbifurkationen von vier Tieren je Versuchsgruppe komplett in 10  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte aufgeschnitten werden. Nach Kernfärbung mit Hämalaun konnten mittels Hellfeldmikroskopie diejenigen Bereiche identifiziert werden, die Bronchialganglien enthielten, und entsprechend angrenzende Schnitte für Inkubation

und Auswertung verwendet werden. Diese Ganglienanschnitte beinhalteten ein bis maximal 18 Neurone (Anschnitt von Zelleib und Zellkern), sowie null bis maximal sieben MHC II-positive Zellen mit angeschnittenem Zelleib, Zellkern und „dendritischem“ Zellfortsatz. Die Neurone imponierten polygonal oder rundlich bis oval. In der Regel lagen die Zellkerne zentral.

Pro Versuchstier wurden 20 Ganglienanschnitte ausgewertet. Es wurde die Zahl der oben beschriebenen MHC II-positiven Zellen pro Ganglienzelle ermittelt. Diese Quantifizierungsweise wurde gewählt, da ein Bezug auf die Fläche des Ganglienanschnittes nicht möglich war, weil sich die Ganglien gegen das umgebende Bindegewebe optisch nicht eindeutig abgrenzen ließen. Die DC fanden sich in direkter Nachbarschaft zu den Nervenzellen oder lagen zwischen diesen. Mit ihren Fortsätzen umgriffen sie förmlich die Nervenzellkörper. Dabei kamen sie nicht spezifisch in der Nähe kleinerer benachbarter Blutgefäße vor.

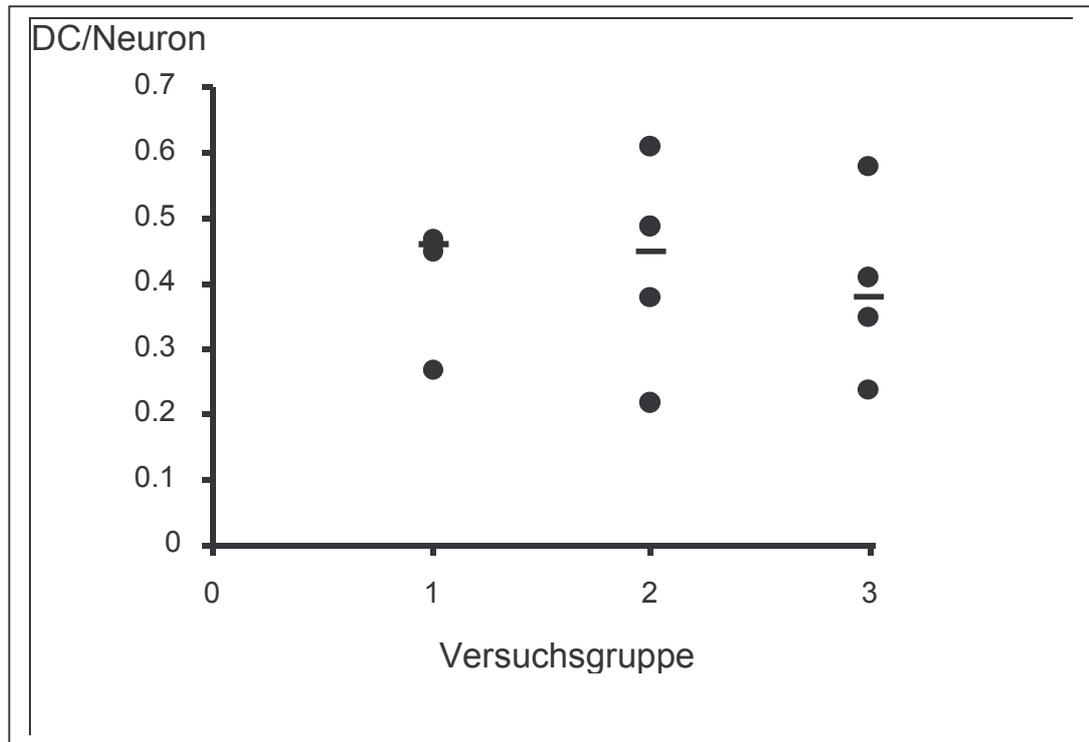
In Gruppe 1, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition, fanden sich 0,46 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Nervenzelle (Median; Minimum: 0,27, Maximum: 0,47).

In den lokalen Atemwegsganglien wurden in Versuchsgruppe 2, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung, 0,45 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Neuron ermittelt (Median; Minimum: 0,22, Maximum: 0,61).

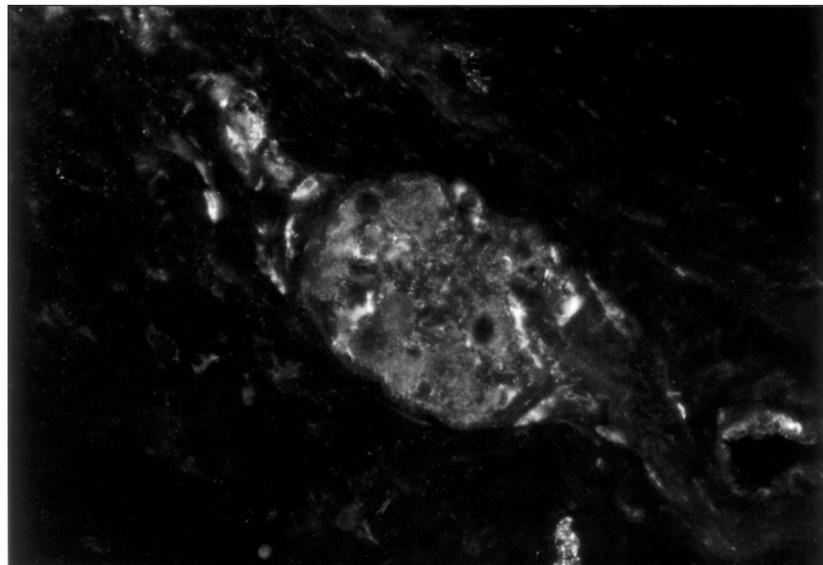
In Versuchsgruppe 3, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion ohne nachfolgende inhalative Allergenprovokation, fanden sich 0,38 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Neuron (Median; Minimum: 0,24, Maximum: 0,58).

Hier bestandt kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

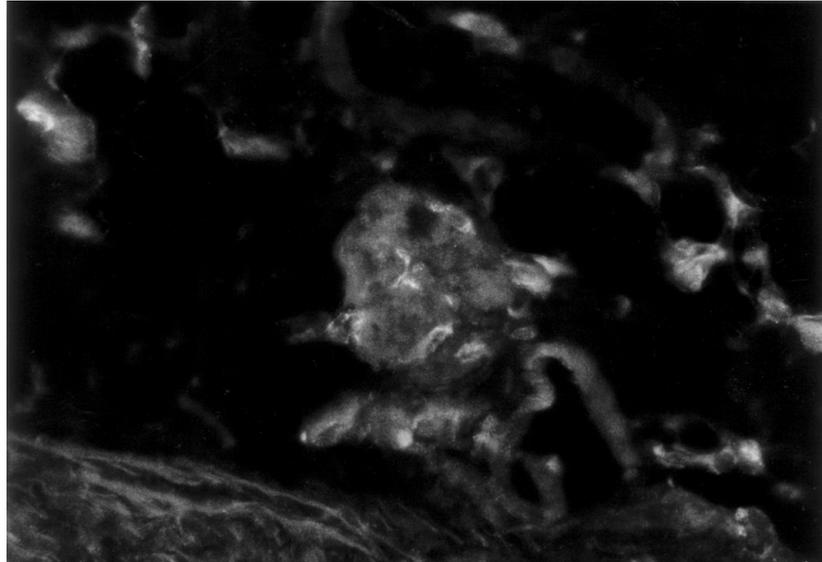
In Abbildung 6 ist die Quantifizierung DC in den intramuralen Atemwegsganglien dargestellt. Die Abbildungen 7-9 zeigen fluoreszenzmikroskopische Darstellungen von DC in den intramuralen Atemwegsganglien der Versuchsgruppen 1-3.



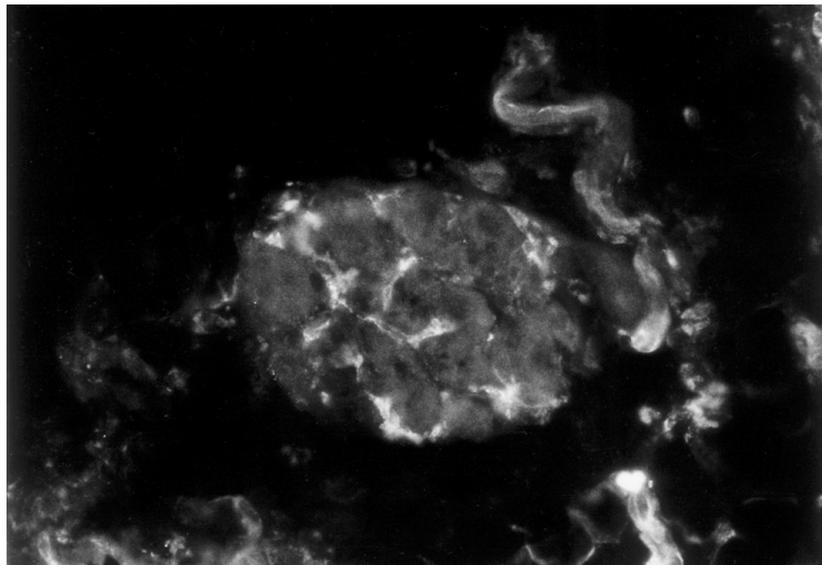
**Abb. 6:** Quantifizierung von DC in den lokalen Atemwegsganglien



**Abb. 7:** DC in den lokalen Atemwegsganglien, Versuchsgruppe 1 (Sensibilisierung und inhalative Provokation)



**Abb. 8:** DC in den lokalen Atemwegsganglien, Versuchsgruppe 2 (inhalative Provokation)



**Abb. 9:** DC in den lokalen Atemwegsganglien, Versuchsgruppe 3 (Sensibilisierung)

### 3.3 Ganglia nodosa

Es wurden die Ganglia nodosa von vier Meerschweinchen pro Versuchsgruppe verwendet.

Aus den 10 µm dicken Schnitten der Ganglien wurden pro Tier zehn Ausschnitte bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Die Ausschnitte enthielten 21 bis maximal 47 Nervenzellen mit angeschnittenem Zelleib und Zellkern. Die Ganglien waren in

umgebendes Bindegewebe eingebettet. Es kamen Nervenfasern im Längs- und Querschnitt zur Darstellung.

Wie in den lokalen Atemwegsganglien wurden auch hier die oben beschriebenen MHC II-positiven Zellen pro Nervenzelle computerassistent ermittelt. Es kamen Ausschnitte mit minimal einer und maximal 18 Zellen vor.

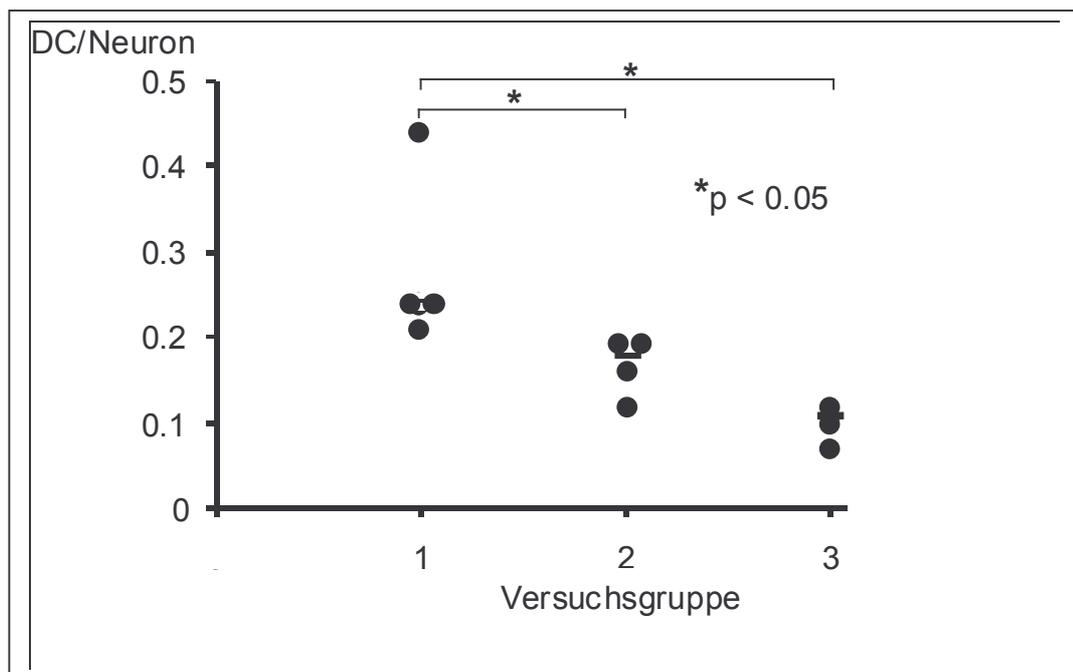
Für Gruppe 1, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition, fanden sich 0,24 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Neuron (Median; Minimum: 0,21, Maximum: 0,44).

Die Quantifizierung ergab für Gruppe 2, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung, 0,18 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz (Median; Minimum: 0,12, Maximum: 0,19).

Als Ergebnis für Gruppe 3, nach Sensibilisierung und inhalative Vehikelexposition, wurden 0,11 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Nervenzelle ermittelt (Median; Minimum: 0,07, Maximum: 0,12).

Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen 1 und 2, sowie 1 und 3 war jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ).

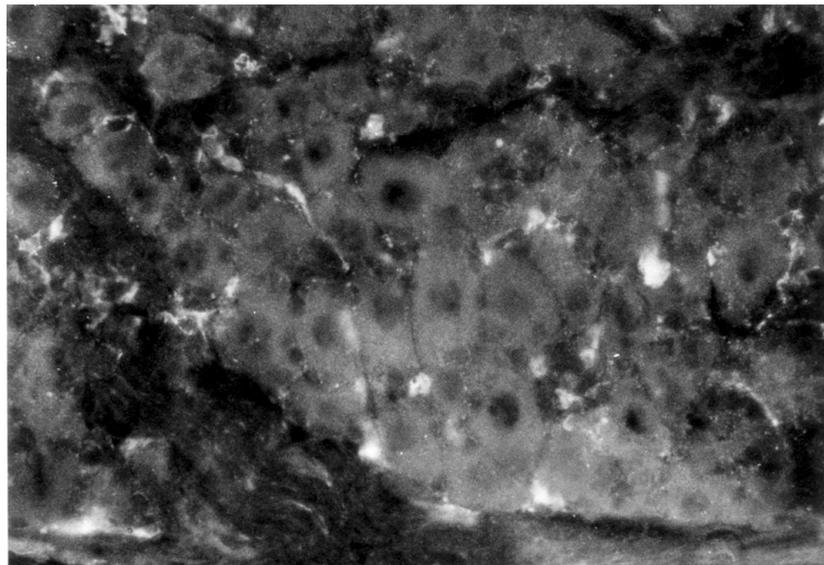
In Abbildung 10 ist die Quantifizierung DC im Ganglion nodosum dargestellt. Die Abbildungen 11-13 zeigen fluoreszenzmikroskopische Darstellungen von DC im Ganglion nodosum der Versuchsgruppen 1-3.



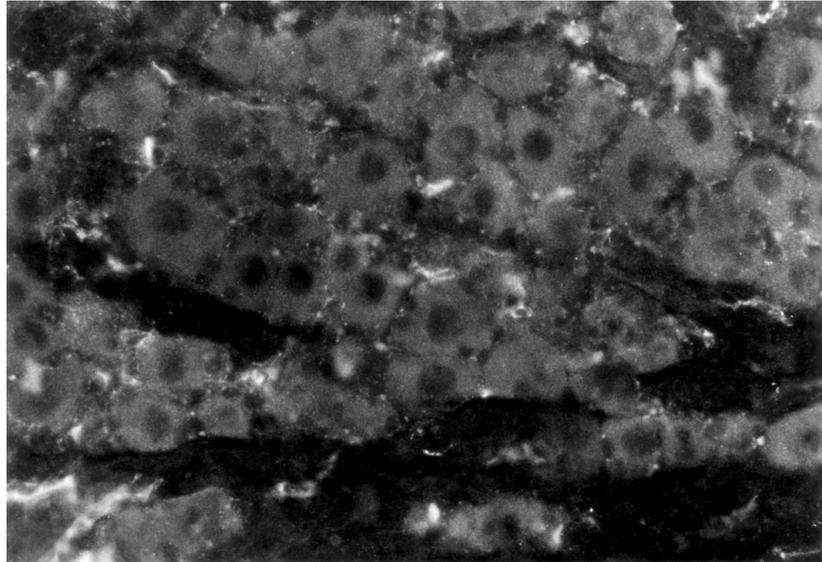
**Abb. 10:** Quantifizierung von DC im Ganglion nodosum



**Abb. 11:** DC im Ganglion nodosum, Versuchsguppe 1 (Sensibilisierung und inhalative Provokation)



**Abb. 12:** DC im Ganglion nodosum, Versuchsguppe 2 (inhalative Provokation)



**Abb. 13:** DC im Ganglion nodosum, Versuchsgruppe 3 (Sensibilisierung)

## **4 Diskussion**

### **4.1 Das Meerschweinchen als Modell des allergischen Asthma bronchiale**

Das am häufigsten verwendete Tiermodell für allergisches Asthma ist die Maus. Bei vielen Versuchsprotokollen mit Mäusen erfolgt die Sensibilisierung wie in dieser Studie mit Ovalbumin (Hamelmann et al. 1999; Isenberg-Feig et al. 2003). Die Maus bietet viele Variationsmöglichkeiten; mit Hilfe gendefizienter und transgener Mäuse lässt sich der Einfluss einzelner Proteine bzw. Zytokine beim allergischen Asthma untersuchen (Hamelmann et al. 1997). Es gibt Stämme von Mäusen, die mit verstärkter Hyperreaktivität der Atemwege reagieren, und solche, die relativ resistent gegenüber Methacholin sind (Takeda et al. 2001). Vargaftig und Mitarbeiter entwickelten mit der Maus ein Modell für Antigen-induzierte bronchiale Hyperreagibilität und Eosinophilie der Atemwege (Eum et al. 1995). Histologische Veränderungen, wie sie für Asthma beim Menschen typisch sind, wurden auch bei Balb/c Mäusen, die intraperitoneal Ovalbumin-sensibilisiert und intratracheal Antigen-provoziert wurden, gefunden: Infiltration der Lamina propria mit mononukleären Zellen, Becherzell-Hyperplasie, Verdickung des Epithels und subepitheliale Fibrose (Blyth et al. 1998; Temelokovski et al. 1998). Dennoch hat die Maus auch Nachteile: Beim menschlichen Asthma sind hauptsächlich die Atemwege in den Erkrankungsprozess einbezogen, während bei der allergischen Entzündung der Maus zusätzlich das Lungenparenchym und die Pleura visceralis betroffen sind. Für die Maus ist kein Modell der allergischen Bronchokonstriktion nach inhalativer Provokation bekannt (Szelenyi 2000). Ebenso tritt bei Mäusen keine Spätphase der Bronchokonstriktion nach 5-8 h ein, wie sie bei vielen Asthmatikern bekannt ist (Szelenyi 2000). Bei atopischen, sensibilisierten Patienten bewirkt inhalativer Kontakt mit dem korrespondierenden Antigen Bronchokonstriktion. Bei aktiv sensibilisierten Mäusen (und auch Ratten) kommt es hingegen nach inhalativer Antigenverabreichung nicht zur Bronchokonstriktion. Dieses Phänomen kann nur durch intravenöse Antigengabe ausgelöst werden (Szelenyi 2000). Bei Mäusen lassen sich weiterhin nach Allergenprovokation im Gegensatz zum Menschen keine Proteine aus Eosinophilen in der bronchoalveolären Lavage (BAL)-Flüssigkeit nachweisen (Lee et al. 2001).

Beim sensibilisierten Meerschweinchen hingegen kommt es 24 Stunden nach Ovalbuminprovokation zu einem Influx von Eosinophilen in die BAL-Flüssigkeit (Underwood et al. 1995). Die erhöhte Anzahl Eosinophiler lässt sich auch nach 72 Stunden noch nachweisen. Pulmonale Eosinophilie kann beim naiven Meerschweinchen durch verschiedene Mediatoren und Zytokine induziert werden; intratracheale Instillation von IL-5 induziert einen signifikanten Anstieg der Zahl Eosinophiler in der BAL-Flüssigkeit (Lilly et al. 1996; Portanova et al. 1995). Mit Hilfe des Meerschweinchenmodells konnte gezeigt werden, dass das Major Basic Protein aus Eosinophilen Epithel-abhängig eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur induziert (Lewis et al. 1978). Das Major Basic Protein blockiert muskarinische M2-Rezeptoren und wirkt somit als Mediator der allergischen Sofortreaktion (Yost et al. 1999). Zaagsma und Mitarbeiter zeigten beim aktiv sensibilisierten und provozierten Meerschweinchen eine frühe (0-5 h) und eine späte Phase (8-23 h nach Antigenprovokation) der Bronchokonstriktion (Ten Berge et al. 1995). Diese Phasen sind der asthmatischen Atemwegserkrankung beim Menschen sehr ähnlich, was einen entscheidenden Vorteil des Meerschweinchens als Modell des Asthma bronchiale darstellt. Everitt und Moore berichten ebenfalls von einer Antigen-induzierten späten Phase der Atemwegsobstruktion beim Meerschweinchen (Everitt et Moore 1992). Untersuchungen von Heuer und Mitarbeitern lassen vermuten, dass die späte Phase der Atemwegsobstruktion auf dem Boden einer Entzündungsreaktion entsteht (Heuer et al. 1996). Sie zeigten beim sensibilisierten Meerschweinchen, dem zusätzlich Polymyxin B inhalativ verabreicht wurde, dass die Spätphase der Obstruktion sowohl durch Methylprednisolon, als auch durch einen Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF)-Antagonisten verhindert werden kann. Mittlerweile ist bekannt, dass PAF zwar bei diesem Modell bedeutsam ist, bei der asthmatischen Entzündung des Menschen jedoch nicht relevant ist, weshalb PAF-Antagonisten beim Menschen auch nicht wirken (Szelenyi 2000). Bei sensibilisierten Meerschweinchen können Dyspnoe und Zunahme des Atemwegswiderstandes durch inhalativ verabreichtes Allergen mit Hilfe der Ganzkörperplethysmografie nicht-invasiv gemessen werden (Chand et al. 1994; Lewis et Broadley 1995). Hashimoto et al. konnten beim Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen zeigen, dass nach Allergenprovokation Mukussekretion und Eosinophilie der Atemwege ausgeprägter waren, wenn zusätzlich Dieselabgase

vernebelt wurden (Hashimoto et al. 2001). Derartige Versuche sind bedeutsam für das Verständnis steigender Inzidenz von Asthma beim Menschen.

In der Meerschweinchen trachea sind DC hauptsächlich in der Lamina propria lokalisiert ( $203/\text{mm}^2$ ) (Lawrence et al. 1997). In Tangentialschnitten der Meerschweinchen trachea wurden nur vereinzelt MHC II-positive Zellen im Epithel gefunden. Die Verteilung der DC beim Meerschweinchen ist der beim Menschen ähnlich (Maarten et al. 1994). Im Gegensatz dazu wurden bei der Ratte DC in der Trachea vorwiegend im Bereich des Epithels gefunden mit einer Dichte von circa  $600/\text{mm}^2$  (Holt et al. 1994; Schon-Hegrad et al. 1991).

Trotz der aufgeführten Vorteile und der Ähnlichkeit zum Menschen hat auch das Meerschweinchen als Modell für die allergische Entzündung Nachteile: Die Manipulationsmöglichkeiten, die bei der Maus zur Verfügung stehen, existieren für das Meerschweinchen nicht. Zudem fehlt es an Meerschweinchen-spezifischen Zytokinen, Chemokinen und Antikörpern. Tendenziell neigen Meerschweinchen wie auch Ratten nach wiederholter Antigenprovokation zu Desensibilisierung (Andrew et al. 1984). Das Meerschweinchen reagiert im Vergleich zum Menschen stärker auf Histamin, was für die stärkere Eosinophilie (ohne Sensibilisierung und Allergenprovokation) verantwortlich sein könnte (Szelenyi 2000). Durch Histamin H1-Rezeptorantagonisten kann die akute Atemwegsverengung wesentlich stärker als beim Menschen reduziert werden (Payne et De Nucci 1987). Bei nicht-invasiven Untersuchungstechniken muss beachtet werden, dass das Größenverhältnis Nase zu Lunge bei kleinen Nagern und Menschen sehr unterschiedlich ist (Smith 1989). Bei Ratten und Meerschweinchen beträgt der Anteil der oberen Atemwege am totalen Atemwegswiderstand 80% (Smith 1989). Deshalb eignet sich weder das Meerschweinchen noch die Ratte zur Messung eines spontanen Anstiegs des Atemwegswiderstands und Übertragung der Messergebnisse auf den Menschen. Sicherlich lässt sich mit keinem Kleintiermodell das menschliche Asthma exakt reproduzieren, dennoch helfen diese Modelle, immunologische und zelluläre Mechanismen in der Entwicklung der allergischen Erkrankung zu verstehen und die Effekte exogener Agenzien auf den Krankheitsverlauf zu untersuchen.

## 4.2 Bronchialschleimhaut

In der Kontrollgruppe, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung, fanden sich in der Lamina propria im Median 281 MHC II-positive Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro mm<sup>2</sup>. Lawrence fand in der Lamina propria der Meerschweinchentrachea mit 203 MHC II-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> ähnliche Werte (Lawrence et al. 1997). Lapa e Silva beschrieb für die Bronchien des Meerschweinchens ebenfalls vergleichbare Werte (Lapa e Silva et al. 1993). Die Auswertung der Bronchialschleimhaut dient in dieser Studie als Kontrolle; das hier verwendete Model bzw. Immunisierungsschema liefert Ergebnisse, die denen anderer Autoren entsprechen. Es gibt viele Studien, die die Lokalisation und Funktion DC in den Atemwegen der Ratte untersuchen (Holt et al. 1994; Schon-Hegrad et al. 1991), jedoch nur wenige, die sich mit diesen Zellen in der Lunge des Meerschweinchens beschäftigen. DC sind bei der Ratte primär im Epithel der Trachea lokalisiert mit einer Dichte von 600/mm<sup>2</sup> (Holt et al. 1994; Schon-Hegrad et al. 1991). Hier bilden sie ein dichtes Netzwerk, dass sich besonders gut durch Tangentialschnitte darstellen lässt (Holt et al. 1994). Im Gegensatz dazu befinden sich in Tangentialschnitten der Trachea des Meerschweinchens nur sehr wenige MHC II-positive Zellen innerhalb des Epithels. In der hier vorliegenden Studie wurden die MHC II-positive Zellen deshalb in der Lamina propria quantifiziert.

Nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition fanden sich mit 467 MHC II-positiven Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro mm<sup>2</sup> Lamina propria ein signifikant höherer Wert als nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung und nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion ohne nachfolgende inhalative Allergenprovokation. Der Anstieg der MHC II-positiven Zellen mit dendritischem Zellfortsatz in der Mukosa der Atemwege sensibilisierter Tiere nach Allergenprovokation gegenüber nicht-sensibilisierten Tieren entspricht den von Lawrence für das Meerschweinchen berichteten Werten (Lawrence et al. 1997). Da für das Meerschweinchen keine spezifischen Antikörper gegen DC erhältlich sind, definierte Lawrence diese Zellen nach folgenden Kriterien: Markierung durch den monoklonalen Anti-Meerschweinchen-Antikörper Cl.13.1, einen Marker für MHC Klasse II, fehlende Markierung durch MR-1, einen Marker für Gewebsmakrophagen, sowie dendritische Morphologie. In dieser Studie wird ebenfalls angenommen, dass es sich bei den

quantifizierten Zellen um DC handelt. Zwar tragen auch diverse andere Zellen MHC Klasse II auf ihrer Oberfläche, wie z.B. Makrophagen und nach Allergisierung auch die Epithelzellen der Atemwege, jedoch unterscheiden sich diese in ihrer Morphologie deutlich von den untersuchten Zellen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen DC des Meerschweinchens ließe sich die Frage klären, ob die dendritischen Fortsätze zur Antigenaufnahme durch das Epithel zum Atemwegslumen durchreichen oder vermehrt DC aus der Lamina propria ins Epithel einwandern. Versuche mit Ratten haben gezeigt, dass ortständige DC eine Turnover-Rate von ungefähr drei Tagen haben (Holt et al. 1994) und dass DC-Vorläufer aus dem Knochenmark in die Atemwege einwandern. Theoretisch besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Zunahme MHC II-positiver Zellen mit entsprechender Morphologie nach Sensibilisierung und Provokation auf einer vermehrten MHC II-Expression ortständiger DC basiert. Studien mit Bakterienexposition unterstützen die Theorie der Einwanderung von unreifen DC mit rundlicher Gestalt und Reifung der DC im Bronchialgewebe (McWilliam et al. 1994).

### **4.3 Ganglion nodosum**

Aus Versuchen mit Ratten ist bekannt, dass die Expression von MHC II-Molekülen im Zentralnervensystem gesunder Tiere von der Integrität der Blut-Hirnschranke abhängig ist. In Regionen, die durch eine intakte Blut-Hirnschranke geschützt sind, kommen keine MHC II-exprimierenden Zellen sowie keine Zellen, die typische Makrophagen-Marker exprimieren, vor (Aloisi et al. 2000; Perry et Lawson 1992). Die Blut-Gewebeschanke, die das periphere Nervensystem schützt, ist funktionell weit weniger dicht als die Blut-Hirnschranke. Intravenös applizierte Tracer lassen sich in endoneuralen Strukturen peripherer Nerven und Ganglien detektieren (Kiernan 1996), wobei die Blut-Gewebe-Schranke großer peripherer Nerven gegenüber Makromolekülen dichter zu sein scheint als die peripherer Ganglien (McDonald et Blewett 1981; Olsson 1968).

Beim Meerschweinchen war das Vorkommen von DC in sensiblen Ganglien bislang nicht bekannt. Nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition fanden sich in der hier vorliegenden Studie für Gruppe 1 im Median 0,24 MHC II-positiv Zellen mit dendritischem Zellfortsatz pro Neuron, während die Quantifizierung für Gruppe 2, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition

ohne vorherige Sensibilisierung, mit 0,18 Zellen und für Gruppe 3, nach Sensibilisierung und inhalativer Vehikelexposition, mit 0,11 Zellen signifikant niedrigere Werte ergab.

Das Neuropeptid CGRP wird aus den sensiblen Nervenendigungen in der Peripherie freigesetzt (Felten 1991) und wirkt auf DC chemotaktisch (Dunzendorfer et al. 2001). Zudem wird durch CGRP ein Abwandern reifer DC Richtung regionärer Lymphknoten verhindert (Dunzendorfer et al. 2001). Bei LC der Epidermis der Maus haben Hosoi et al. für CGRP inhibitorische Effekte auf Antigenpräsentation und Stimulation spezifischer T-Zellen nachgewiesen (Hosoi et al. 1993). Diese inhibitorischen Effekte von CGRP kommen zumindest teilweise durch die Unterdrückung der Hochregulation von B7, einem wichtigen Kostimulator bei der Antigenpräsentation durch MHC II-Moleküle, zustande (Asahina et al. 1995). Andererseits unterdrückt CGRP die Produktion des Zytokins IL-10 in LC (Torii et al. 1997). IL-10 supprimiert die Th1-vermittelte Immunität durch Unterdrückung der Antigenpräsentation an Th1 Zellen (Enk et al. 1993).

Neuropeptide können aber nicht nur aus Nervenendigungen, sondern auch im Bereich des Perikarion freigesetzt werden (Huang et Neher 1996). Huang und Neher zeigten, dass bei Säugetieren aus den Somata sensibler Neurone per Exozytose  $Ca^{2+}$ -abhängig Neuropeptide ausgeschüttet werden können. Zhang und Zhou fanden später Hinweise, dass dieser Vorgang eher Spannungs- als Kalzium-abhängig funktioniert (Zhang et Zhou 2002).

Seit Mitte der 90er Jahre ist die Plastizität der afferenten Innervation der Atemwege bekannt. Neuroanatomische Tracing-Techniken haben gezeigt, dass beim Meerschweinchen 10 % der Neurone des die Atemwege versorgenden Ganglion nodosum nach Sensibilisierung und Allergenprovokation Tachykinine und auch CGRP enthalten. Nach Vehikelbehandlung und Allergenexposition kommen jedoch ebenso wie bei normalen Kontrolltieren in den die Lunge versorgenden Neuronen des Ganglion nodosum keine Tachykinine und kein CGRP vor (Kummer et Fischer 1995). Eine vermehrte CGRP-Synthese im Ganglion nodosum nach Sensibilisierung und Allergenprovokation mit konsekutiver CGRP-Freisetzung aus dem Perikaryon könnte somit für das vermehrte Vorkommen MHC II-positiver Zellen in Gruppe 1 verantwortlich sein. Das Phänomen, dass sich ein primär peripherer Einfluss auf das Nervensystem in einer Ansammlung MHC II-positiver Zellen in Perikaryonnähe widerspiegelt, ist auch aus Versuchen mit Durchtrennung des Nervus ischiadicus

bekannt (Lu et Richardson 1993). Hier induzierte eine periphere Nervenverletzung eine Rekrutierung oder Proliferation von MHC II-positiven Zellen im korrespondierenden Spinalganglion.

Unklar bleibt, welche Aufgabe den MHC II-positiven Zellen im Ganglion nodosum zukommt. Die Expression von MHC II Molekülen bedeutet nicht zwangsläufig eine Aktivierung von T-Helferzellen. Antigen-präsentierende Zellen können auch die Differenzierung in T-Suppressorzellen induzieren (Usui et al. 1984). Von Makrophagen weiß man, dass sie in Ganglien bei der Entsorgung von axonalem und Myelin-haltigem Debris helfen (Stoll et al. 1989), die Proliferation von Schwannzellen induzieren können (Beuche et Friede 1984; Baichwal et al. 1984) und über Interleukin-1 die Synthese von nerve growth factor (NGF) durch Schwannzellen fördern (Lindholm et al. 1987). An einem Model der Autoimmunneuritis und des Guillain-Barre Syndroms konnte gezeigt werden, dass Makrophagen als wichtige Effektorzellen bei der Demyelinisierung wirken und hierbei intensiv mit T-Lymphozyten interagieren (Hartung et Tyoka 1990). Im Rahmen von Untersuchungen zur Herpes simplex Infektion beim Kaninchen fanden Kang et al., dass Lymphozyten im latent infizierten Trigeminalganglion persistieren (Kang et al. 2003). Die Lymphozyten scheinen hier eine Rolle bei der Reaktivierung von Herpes simplex zu spielen (Liu et al. 1996; Shimeld et al. 1995).

Denkbar wäre, dass durch CGRP angelockte DC im Ganglion nodosum unter dem Einfluss von CGRP an der Antigenpräsentation gehindert werden (Hosoi et al. 1993) und somit hier ein regulierender Mechanismus auf die Entwicklung der allergischen Reaktion vorliegt. Carucci et al. haben für humane DC den CGRP-Rezeptor Typ 1 nachgewiesen und vermuten, dass über diesen Rezeptor die durch reife DC induzierte T-Zellproliferation gedämpft wird (Carucci et al. 2000). Zur definitiven Einordnung der Befunde dieser Studie sind jedoch weitere Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen MHC II-positiven Zellen und Neuronen erforderlich.

#### 4.4 Lokale Atemwegsganglien

Frühere Studien an isolierten Bronchien von Ovalbumin-sensibilisierten Meerschweinchen haben gezeigt, dass Mastzellen, die sich in den parasympathischen intramuralen Ganglien befinden, nach Antigen-Provokation degranulieren und parallel dazu elektrophysiologische Veränderungen bezüglich der synaptischen Übertragung in den entsprechenden Ganglien auftreten (Myers et al. 1991). Diese elektrophysiologischen Veränderungen bestehen im Wesentlichen aus einer Steigerung der Effizienz der synaptischen Übertragung (Undem et al. 1991). Der präganglionäre Input wird weniger stark gefiltert (Mitchell et al. 1987), so dass es zu einer generalisierten Erhöhung des „parasympathischen Tonus“ in den Atemwegen kommt. Es ist wahrscheinlich, dass diese Effekte durch Mastzellmediatoren wie Histamin, Leukotriene und Prostaglandin D<sub>2</sub> verursacht werden (Myers et al. 1991; Myers et Undem 1995), möglicherweise auch durch Mediatoren anderer Entzündungszellen (Costello et al. 1997).

Bislang gab es keine Informationen über das Vorkommen von DC in lokalen, parasympathischen Ganglien. Erst kürzlich wurden in den kardialen parasympathischen Ganglien der Ratte MHC II-positive Zellen gefunden (Kummer et al. 2005). Ihre relative Anzahl entspricht mit 0,5 pro Neuron (Kummer et al. 2005) der hier in den Atemwegsganglien des Meerschweinchens (0,46) beobachteten Anzahl von DC.

Im Gegensatz zum sensiblen Ganglion nodosum unterschieden sich die relativen Anzahlen von DC in den Atemwegsganglien in den Versuchsgruppen 1, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition, 2, nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung, und 3, nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion ohne nachfolgende inhalative Allergenprovokation, nicht signifikant voneinander. Als eine mögliche Ursache für die Vermehrung von DC im Ganglion nodosum nach Sensibilisierung und Allergenprovokation wurde eine Ausschüttung von CGRP aus den Somata der sensiblen Neurone angenommen. Lokale Atemwegsneurone des Meerschweinchens sind cholinerg und enthalten im Regelfall keine zusätzlichen bekannten Neuropeptide (Kummer et al. 1992), so dass eine solche somatische Ausschüttung von CGRP als chemotaktischer Faktor für DC hier nicht in Frage kommt. Dennoch kommt CGRP in lokalen Atemwegsganglien vor. Dieses Neuropeptid ist in vereinzelten

Axonendigungen sensibler Nervenfasern enthalten, die innerhalb des Ganglions zusätzlich zu den präganglionären Axonen Kontakt mit den postganglionären Neuronen aufnehmen (Kummer 1992). Zum einen muss berücksichtigt werden, dass im Ganglion nodosum die Ausschüttung aus dem Zellkörper erfolgt und nicht aus Nervenendigungen. Hierbei handelt es sich um grundsätzlich unterschiedlich geregelte Prozesse (Huang et Neher 1996). Zum anderen entstammen diese sensiblen Nervenfasern nicht aus dem Ganglion nodosum, sondern entweder aus Spinalganglien oder dem vagalen Ganglion jugulare, welches funktionell vom Ganglion nodosum differente Nervenzellpopulationen enthält (Riccio et al. 1996): Das Ganglion nodosum enthält für die Innervation der Atemwege die Somata überwiegend schnell leitender A $\delta$ -Fasern. Dies sind schnell adaptierende Irritantienrezeptoren, sie adaptieren ebenfalls schnell gegenüber mechanischen Stimuli, haben eine relativ niedrige Reizschwelle für mechanische Reize und werden nicht durch Capsaicin aktiviert. Im Gegensatz dazu enthält das Ganglion jugulare die Somata ungefähr gleich vieler myelinisierter A $\delta$ - und unmyelinisierter C-Fasern. Diese adaptieren langsam gegenüber mechanischer Stimulation, haben eine höhere Schwelle für mechanische Reize und lassen sich oft durch Capsaicin aktivieren. Da die neuropeptidhaltigen Endigungen innerhalb der Bronchialganglien durch Capsaicin aktivierbar sind (Myers et al. 19996), entstammen sie nicht dem Ganglion nodosum. Im Ganglion jugulare ist im Gegensatz zum Ganglion nodosum eine Zunahme der CGRP-Produktion durch Sensibilisierung und Allergenprovokation nicht bekannt (Fischer et al. 1996). Entsprechend gibt es auch keinen Hinweis für Veränderungen CGRP-immunreaktiver Fasern in den lokalen Atemwegsganglien, die Einfluss auf die dortige Anzahl von DC nehmen könnten.

## 5 Zusammenfassung

Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem sind für die Regulation der Atemwege unter normalen Bedingungen und bei allergischen Entzündungen wie zum Beispiel dem Asthma bronchiale von wesentlicher Bedeutung.

Am Beginn der Immunantwort stehen DC, die für die Antigenpräsentation wesentlich sind. DC sind nicht nur für die Reaktion vom Soforttyp, sondern auch für die Spätreaktion, die nach max. 24 Stunden beginnt, mitverantwortlich (Lambrecht et al. 1998). Es ist bekannt, dass DC in enger räumlicher Nähe zu Nervenzellen vorkommen. Aus den Perikaryen sensibler Neurone werden Neuropeptide wie CGRP freigesetzt, die DC anlocken können (Dunzendorfer et al. 2001; Huang et Neher 1996). In der hier vorliegenden Studie wurde untersucht, ob auch in den Atemwegen eine enge Beziehung zwischen DC und Nervensystem besteht und ob DC in den Ganglien der Atemwegsinnervation unter allergisch-entzündlichen Bedingungen ähnlichen Veränderungen unterworfen sind wie die DC der Schleimhaut.

Als Modell des Asthma bronchiale dienten gegen Ovalbumin sensibilisierte und einmalig inhalativ Allergen-provozierte Meerschweinchen. An Gefrierschnitten der Lunge und sensibler Vagusganglien wurden die DC mit einem monoklonalen Antikörper gegen den major histocompatibility complex der Klasse II und Nervenzellen mit einem Antiserum gegen protein gene product 9.5 mittels indirekter Immunfluoreszenz dargestellt. Die Zahl der DC wurde in der Schleimhaut, in den lokalen Atemwegsganglien und in den sensiblen Ganglien des Nervus vagus nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion und inhalativer Ovalbumin-Exposition (Versuchsgruppe 1), nach inhalativer Ovalbumin-Exposition ohne vorherige Sensibilisierung (Versuchsgruppe 2) und nach intraperitonealer Ovalbumin-Injektion ohne nachfolgende inhalative Allergenprovokation (Versuchsgruppe 3) bestimmt. Die Allergen-Provokation nach Sensibilisierung führte an diesem Meerschweinchenmodell annähernd zu einer Verdopplung der Anzahl DC pro definiertem Schleimhautareal. In den lokalen Atemwegsganglien wurden erstmals DC mit einer Häufigkeit von circa 0,5 DC pro Nervenzelle beschrieben. Diese Relation verändert sich nach Sensibilisierung oder Sensibilisierung und Allergenprovokation nicht signifikant. Im weiter entfernt unterhalb der Schädelbasis liegenden sensiblen Ganglion des Nervus vagus (Ganglion nodosum) dagegen liegt die relative Zahl der DC mit circa 0,1 pro Nervenzelle niedriger als in den lokalen

Atemwegsganglien. Sensibilisierung und inhalative Allergenprovokation führen hier zu einem Anstieg der DC auf Werte von circa 0,3 DC pro Neuron.

Der Anstieg der DC in der Mucosa der Atemwege sensibilisierter Tier nach Allergenprovokation entspricht den von anderen Autoren angegebenen Werten (Lawrence et al. 1997). Beim Meerschweinchen war das Vorkommen von DC in sensiblen Ganglien bislang nicht bekannt. Neuroanatomische Tracing-Techniken haben Mitte der 90er Jahre gezeigt, dass beim Meerschweinchen 10 % der Neurone des die Atemwege versorgenden sensiblen Ganglion nodosum nach Sensibilisierung und Allergenprovokation Tachykinine und auch CGRP enthalten. Nach Vehikelbehandlung und Allergenexposition kommen jedoch ebenso wie bei normalen Kontrolltieren in den die Lunge versorgenden Fasern des Ganglion nodosum keine Tachykinine und kein CGRP vor (Kummer et Fischer 1995). Die vermehrte CGRP-Synthese im Ganglion nodosum nach Sensibilisierung und Allergenprovokation mit konsekutiver CGRP-Freisetzung aus dem Perikaryon könnte somit für das vermehrte Vorkommen von DC in Gruppe 1 verantwortlich sein. Bisher gab es keine Informationen über das Vorkommen von DC in lokalen, parasymphatischen Ganglien der Atemwege des Meerschweinchens. Hier enthalten die Nervenzellkörper jedoch im Unterschied zum Ganglion nodosum kein CGRP. Zwar kommen auch in den lokalen Atemwegsganglien CGRP-haltige Nervenfasern vor (Kummer 1992), diese entstammen jedoch dem Ganglion jugulare, dessen afferente Atemwegsfasern sich sowohl funktionell als auch anatomisch von den Fasern des Ganglion nodosum unterscheiden (Riccio et al. 1996). Für die Neurone des Ganglion jugulare, deren CGRP-haltige Nervenfasern die peribronchialen Ganglien erreichen, ist eine Aktivierung im Sinne gesteigerter Neuropeptid-Immunreaktivität bei Allergie wie für die Irranzienrezeptoren des Ganglion nodosum nicht gefunden worden (Kummer et Fischer 1995). Zudem handelt es sich bei der CGRP-Freisetzung aus Nervenendigungen in den peribronchialen Ganglien um einen grundsätzlich anderen Prozess als die Zellkörper-nahe Ausschüttung im Ganglion nodosum (Huang et Neher 1996). Obwohl die funktionelle Bedeutung der DC in den Ganglien der Atemwegsinnervation bisher weitgehend unklar ist, weisen die hier für das Ganglion nodosum beschriebenen quantitativen Veränderungen von DC nach Sensibilisierung und Allergen-Provokation auf eine Verknüpfung im Rahmen des allergischen Entzündungsgeschehen hin.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adcock IM, Peters M, Gelder C, Shirasaki H, Brown CR, Barnes PJ.**

Increased tachykinin receptor gene expression in asthmatic lung and its modulation by steroids.  
J Mol Endocrin. 1993;11:1-7.

**Ader RJ, Cohen N, Felten D.**

Psychoneuroimmunology: interaction between the nervous system and the immune system.  
Lancet. 1995;99-103.

**Aloisi F, Ria F, Adorini L.**

Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes.  
Immunol Today. 2000;21:141-147.

**Amigorena S, Webster P, Drake J, Newcomb J, Cresswell P, Mellman I.**

Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex II vesicles.  
J Exp Med. 1995;181:1729-1741.

**Andrew KK, Schellenberg RR, Hogg JC, Hanna CJ, Pare PD.**

Physiological and immunological effects of chronic antigen exposure in immunized guinea pigs.  
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1984;75:208-213.

**Arndt SO, Vogt AB, Marcovic-Plese S.**

Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells.  
EMBO J. 2000;19:1241-1251.

**Asahina A, Moro O, Hosoi J, Lerner EA, Xu S, Takashima A, Granstein RD.**

Specific induction of cAMP in Langerhans cells by calcitonin gene-related peptide: relevance to functional effects.  
Proc Natl Acad Sci. 1995;92:8323-8327.

**Baichwal RR, Bigbee JW, Devries GH.**

Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells.  
Proc Natl Acad Sci. 1984;85:1701-1705.

**Baluk P, Gabella G.**

Fine structure of the autonomic ganglia of the mouse pulmonary vein.  
J Neurocytol. 1987;16:169-184.

**Banchereau J, Briere F, Caux C.**

Immunobiology of dendritic cells.  
Annu Rev Immunol. 2000;18:767-811.

**Barnes PJ.**

Neural control of human airways in health and disease.  
Am Rev Respir Dis. 1986;134:1289-1314.

**Bellinghausen I, Brand U, Knop J, Saloga J.**

Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naive memory T helper cells of such donors.  
J Allergy Clin Immunol. 2000;105:988-996.

**Beuche W, Friede RL.**

The role of non-resident cells in Wallerian degeneration.  
J Neurocytol. 1984;13:767-796.

**Blyth DI, Pedrick MS, Savage TJ, Bright H, Beesley JE, Sanjar S.**

Induction, duration and resolution of airway goblet cell hyperplasia in a murine model of atopic asthma: effects of concurrent infection with respiratory syncytial virus and response to dexamethasone.

Am J Respir Cell Mol Biol. 1998;19:38-54.

**Bochner BS, Udem BJ, Lichtenstein LM.**

Immunologic aspects of allergic asthma.

Annu Rev Immunol. 1994;12:295-336.

**Canning BJ, Fischer A, Kummer W.**

Evidence for an esophageal origin of VIP-IR and NO synthase-IR nerves innervating the guinea pig trachealis: a retrograde neuronal tracing and immunohistochemical analysis.

J Comp Neurol. 1998;394:326-334.

**Carayol N, Campbell AM, Vachier I.**

Modulation of cadherin and catenins expression by tumor necrosis factor- $\alpha$  and dexamethasone in human bronchial epithelial cells.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2004;26:341-347.

**Carucci JA, Ignatius R, Wei Y, Cypess AM, Schaer DA, Pope M, Steinman RM, Mojsov S.**

Calcitonin gene-related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related receptor.

J Immunol. 2000;164:3494-3499.

**Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A.**

Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.

Nature. 1997;388:782-787.

**Cella M, Jarrossay D, Facchetti F.**

Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.

Nature Med. 1999a;5:919-923.

**Cella M, Salio M, Scheidegger D.**

Dendritic Cells.

1999b;631-636.

**Chand N, Diamantis W, Nolan K, Pillar J, Sofia RD.**

Azelastin inhibits acute allergic dyspnea in a conscious guinea pig asthma model.

Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1994;85:209-216.

**Chang CC, Wright A, Punnonen J.**

Monocyte-derived CD1a<sup>+</sup> and CD1a<sup>-</sup> dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation.

J Immunol. 2000;165:3584-3591.

**Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB, Fryer AD.**

Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 1997;273:93-103.

**Cox D, Lee DJ, Dale BM, Calafat J, Greenberg S.**

A Rab 11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis.

Proc Natl Acad Sci. 2000;97:680-685.

**Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I.**

Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleucine-1 beta for migration.

Immunology. 1997;92:388-395.

**Cyster JG.**

Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.  
Science. 1999;286:2098-2102.

**D'Amico G, Bianchi G, Bernasconi S.**

Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells.  
Blood. 1998;92:207-214.

**DeSimone C, Ferrari M, Ferrarelli G, Rumi C, Pugnali F, Sorice F.**

The effects of substance P on human eosinophil receptors and functions.  
Ann N Y Acad Sci. 1987;496:226-232.

**Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A.**

Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites.  
J Exp Med. 1998;188:373-386.

**Doidge JM, Satchall DG.**

Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways.  
J Auton Nerv Syst. 1982;5:83-99.

**Dong X, Storcus WJ, Salter RD.**

Binding and uptake of agalactosyl IgG by mannose receptor on macrophages and dendritic cells.  
J Immunol. 1999;163:5427-5434.

**Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM.**

J Cell Biol. 1999;147:775-790.

**Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ.**

Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells.  
J Immunol. 2001;166:2167-2172.

**Ellis JL, Udem BJ.**

Antigen-induced enhancement of noncholinergic contractile responses to vagus nerve and electrical field stimulation in guinea pig isolated trachea.  
J Pharmacol Exp Ther. 1992;262:646-653.

**Engeman TM, Gorbachev AV, Gladue RP.**

Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hapten sensitization.  
J Immunol. 2000;164:5207-5214.

**Enk AH, Angaloni VL, Udey MC, Katz SI.**

Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL10.  
J Immunol. 1993;151:2390-2398.

**Escher E, Couture R, Poulos C, Pinas N, Mizrahi J, Theodoropoulos D, Regoli D.**

Structure-activity studies on the c-terminal amide of substance P.  
J Med Chem. 1982;25:1317-1321.

**Eum SY, Haile S, Lefort J, Huerre M, Vargaftig BB.**

Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleucine 5-dependent bronchial hyperresponsiveness.  
Proc Nat Acad Sci. 1995;92:12290-12294.

**Evratt BJ, Moore MD.**

Antigen-induced late-phase airway obstruction in the guinea pig.  
Agents Actions. 1992;37:158-161.

**Felten DL.**

Neurotransmitter signalling of cells of the immune system: important progress, major gaps.  
Brain Behav Immun. 1991;2-8.

**Ferrero E, Vettoretto K, Bondanza A.**

uPA/uPAR system is active in immature dendritic cells derived from CD14+CD34+ precursors and is down-regulated upon maturation.  
J Immunol. 2000;164:712-718.

**Fischer A, Canning BJ, Kummer W.**

Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyl-transferase in the airway innervation.  
Ann N Y Acad Sci. 1996;805:717-722.

**Fischer A, Hoffmann B.**

Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airway and in vagal sensory ganglia of man: correlation with neuropeptides.  
Am J Respir Crit Care Med. 1996;154:209-216.

**Fischer A, McGregor GP, Saria A, Kummer W.**

Induction of tachykinin-gene and -peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation.  
J Clin Invest. 1996;98:2284-2291.

**Foreman JC, Jordan CC, Oehme P, Renner H.**

Structure activity relationships for some substance P related peptides that cause wheal and flare reactions in human skin.  
J Physiol. 1983;335:449-465.

**Forster R, Schubel A, Breitfeld D.**

CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs.  
Cell. 1999;99:23-33.

**Franc NC, White K, Ezekowitz RA.**

Phagocytosis and development: back to the future.  
Curr Opin Immunol. 1999;11:47-52.

**Frossard N, Advenier C.**

Tachykinin receptors and the airways.  
Life Sci. 1991;49:1941-1953.

**Fryer AD, Wills-Karp M.**

Dysfunction of M2-muscarinic receptors in pulmonary parasympathetic nerves after allergen-challenge.  
J Appl Physiol. 1991;71:2255-2261.

**Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ.**

Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.  
Cell. 2000;100:575-585.

**Grube D.**

Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions.  
Histochemistry. 1980;66:149-167.

**Gunzer M, Schafer A, Borgmann S.**

Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential.  
Immunity. 2000;13:323-332.

**Hamelmann E, Oshiba A, Schwarze J.**

Allergen-specific IgE and IL-5 are essential for the development of airway hyperresponsiveness.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16:674-682.

**Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW.**

Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness: a murine model.  
Allergy. 1999;54:297-305.

**Harding CV, Unanue ER.**

Antigen processing and intracellular Ia. Possible roles of endocytosis and protein synthesis in Ia function.  
J Immunol. 1989;142:12-19.

**Hart R, Dancygier H, Wagner F, Lersch M, Classen M.**

Effects of substance P on immunoglobulin and interferon-gamma secretion by cultured human duodenal mucosa.  
Immunol Lett. 1990;23:199-204.

**Hartung H-P, Wolters KV, Toyka KV.**

Substance P: Binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages.  
J Immunol. 1986;136:3856-3863.

**Hartung HP, Tyoka KV.**

T-cell and macrophage activation in experimental autoimmune neuritis and Guillain-Barre syndrome.  
Ann Neurol. 1990;27:57-63.

**Hashimoto K, Ishii Y, Uchida Y.**

Exposure to diesel exhaust exacerbates allergen-induced airway responses in guinea pigs.  
Am J Respir Crit Care Med. 2001;164:1957-1963.

**Heuer HO, Wenz B, Jennewein HM, Urich K.**

Pharmacological characterisation of a new model of antigen-induced pulmonary late-phase reaction in the conscious guinea pig with use additional polymyxin B inhalation.  
J Lipid Med Cell Signal. 1996;15:17-28.

**Hilkens CMU, Kalinski P, deBoer M, Kapsenberg ML.**

Human dendritic cells require exogenous interleucine-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype.  
Blood. 1997;90:1920-1926.

**Hollenberg MD.**

Mechanisms of receptor-mediated transmembrane signalling.  
Experientia. 1986;42:718-727.

**Hollinshead MB, Gertner SB.**

Mast cell changes in denervated sympathetic ganglia.  
Exp Neurol. 1969;24:487-496.

**Holm AF, Fokkens WJ, Godthelp T.**

Effect of 3 months' nasal steroid therapy on nasal T cells and Langerhans cell in patients suffering from allergic rhinitis.  
Allergy. 1995;50:204-209.

**Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD.**

Origin and steady-state turnover of Class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways.  
J Immunol. 1994;153:256-261.

**Holt PG, Macaubas C, Stumbles PA, Sly PD.**

The role of allergy in the development of asthma.  
Nature. 1999;402:12-17.

**Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD.**  
Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide.  
*Nature*. 1993;363:

**Huang LY, Neher E.**  
Ca(2+)-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons.  
*Neuron*. 1996;17:135-145.

**Isenberg-Feig H, Justice P, Keane-Myers A.**  
Animal models of allergic asthma.  
*Current Allergy and Asthma Reports*. 2003;3:70-78.

**Iwamoto I, Yamazaki H, Nakagawa N, Kimura A, Tomioka H, Yoshida S.**  
Differential effects of two C-terminal peptides of substance P on human neutrophils.  
*Neuropeptides*. 1990;16:103-107.

**Jahnsen FL, Moloney ED, Hogan T.**  
Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge.  
*Thorax*. 2001;56:823-826.

**Kang SW, Seo SK, Hill JM, Kwon B, Lee HW, Cho H, Vinay D, Kwon BS.**  
Changes in gene expression in latent HSV-1-infected rabbit trigeminal ganglia following epinephrine iontophoresis.  
*Curr Eye Res*. 2003;26:225-229.

**Kiernan JA.**  
Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous system: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier.  
*Microsc Res Tech*. 1996;35:122-136.

**Knight DA, Lim S, Scaffidi AK.**  
Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma.  
*J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:797-803.

**Kummer W.**  
Ultrastructure of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerve fibres in guinea-pig peribronchial ganglia.  
*Regul Pept*. 1992;37:135-142.

**Kummer W, Fischer A.**  
Tissue distribution of neutral endopeptidase 24.11 activity in guinea pig trachea.  
*Neuropeptides*. 1991;18:181-186.

**Kummer W, Fischer A.**  
Plasticity of the afferent innervation of the airways.  
*Pulm Pharmacol*. 1995;8:169-172.

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

**Kummer W, Stommel C, Grau V.**  
MHC class II antigen-expressing cells in cardiac ganglia of the rat.  
*Cell Tissue Res*. 2005; 319:37-48.

**Kuo HP, Rohde JA, Tokuyama K, Barnes PJ, Rogers DF.**  
Capsaicin and sensory neuropeptide stimulation of goblet cell secretion in guinea pig trachea.  
*J Physiol*. 2003;431:629-641.

**Lambrecht BN.**

Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation.  
Respir Res. 2001;2:133-138.

**Lambrecht BN, Carro-Muino I, Vermaelen KY, Pauwels RA.**

Allergen-induced changes in bonemarrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1999;20:1165-1174.

**Lambrecht BN, Hammad H.**

The other cells in asthma: dendritic cell and epithelial cell crosstalk.  
Curr Opin Pulm Med. 2003;9:34-41.

**Lambrecht BN, Pauwels RA, Fazekas De St Groth B.**

Induction of rapid T cell activation, division and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model.  
J Immunol. 2000;164:2937-2946.

**Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA.**

Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice.  
J Immunol. 1998;160:4090-4097.

**Landry Y, Bloch JG, Mousli M, Bueb JL, Bronner C.**

Neuropeptides et inflammation: Mechanismes presumes de l'inflammation neurogene.  
Path Biol. 1990;38:53-56.

**Lanzavecchia A.**

Mechanisms of antigen uptake for presentation.  
Curr Opin Immunol. 1996;8:348-354.

**Lanzavecchia A, Sallusto F.**

Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells.  
Science. 2000;290:92-97.

**Lapa e Silva JR, Bachelet C-M, Pretolani M, Baker D, Scheper RJ, Vargaftig BB.**

Immunopathologic alterations in the bronchi of the immunized guinea pig.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1993;9:44-53.

**Larsen GL, Renz H, Loader JE, Bradley KL, Gelfand EW.**

Airway response to electrical field stimulation in sensitized inbred mice. Passive transfer of increased responsiveness with peribronchial lymph nodes.  
J Clin Invest. 1992;89:747-752.

**Lawrence TE, Millecchia LL, Frazer DG, Fedan JS.**

Pulmonary Dendritic Cell Distribution and Prevalence in Guinea Pig Airways: Effect of Ovalbumin Sensitization and Challenge.  
J Pharmacol Exp Ther. 1997;282:995-1004.

**Lee NA, Gelfand EW, Lee JJ.**

Pulmonary T cells and eosinophils: coconspirators or independent triggers of allergic respiratory pathology?  
J Allergy Clin Immunol. 2001;107:945-957.

**Lei YH, Barnes PJ, Rogers DF.**

Inhibition of neurogenic plasma exsudation in guinea pig airways by CP-96.345, a new non-peptide NK1 receptor antagonist.  
Br J Pharmacol. 1992;105:261-262.

**Lens JW, Drexhage HA, Benson W, Balfour BM.**

A study of cells present in lymph draining from a contact allergic reaction in pigs sensitized to DNFB.  
Immunology. 1983;49:415-422.

**Lewis CA, Broadley KJ.**

Airway hyper- or hyporeactivity to inhaled spasmogens 24 h after ovalbumin challenge of sensitized guinea pigs.  
Br J Pharmacol. 1995;116:2351-2358.

**Lewis DM, Lewis JC, Loegering DA, Gleich GJ.**

Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule.  
J Cell Biol. 1978;77:702-713.

**Lilly CM, Chapman RW, Sehring SJ, Mauser PJ, Egan RW, Drazen JM.**

Effects of interleucins 5-induced pulmonary eosinophilia on airway reactivity in the guinea pig.  
Am J Physiol. 1996;270:368-375.

**Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H.**

Interleucins-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve.  
Nature. 1987;330:658-659.

**Liu T, Tang Q, Hendricks RL.**

Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection.  
J Virol. 1996;70:264-271.

**Lou YP, Lee LY, Satoh H, Lundberg JM.**

Inhibitory effects of capsazepine and the NK2 antagonist SR 48.968 on bronchoconstriction evoked by sensory nerve stimulation in guinea pigs.  
Br J Pharmacol. 1992;109:765-773.

**Lu X, Richardson PM.**

Responses of macrophages in rat dorsal root ganglia following peripheral nerve injury.  
J Neurocytol. 1993;22:334-341.

**Lundberg JM, Martling C-R, Hökfelt T.**

Airways, oral cavity and salivary glands: classical transmitters and peptides in sensory and autonomic motor neurons.  
Handbook of chemical neuroanatomy. 1988

**Maarten J, van Haarst W, de Wit HJ, Drexhage HA, Hoogsteden HC.**

Distribution and immunophenotype of mononuclear phagocytes and dendritic cells in the human lung.  
Cell Mol Biol. 1994;10:487-492.

**Maggi CA, Giachetti A, Dey RD, Said SI.**

Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins.  
Physiol Rev. 1995;277-322.

**Martling C-R, Saria A, Fischer JA, Hökfelt T, Lundberg JM.**

Calcitonin gene-related peptide and the lung: neuronal coexistence with substance P, release by capsaicin and vasodilatory effect.  
Regul Pept. 1988;20:125-139.

**Masten BJ, Yates JL, Pollard Koga AM, Lipscomb MF.**

Characterization of accessory molecules in murine lung dendritic cell function: roles for CD80, CD86, CD54 and CD40C.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1997;16:335-342.

**McDonald DM, Blewett RW.**

Location and size of carotid body-like organs (paraganglia) revealed in rats by the permeability of blood vessels to Evans blue dye.  
J Neuropathol. 1981;10:607-643.

**McGillis JP, Organist ML, Payan DG.**

Substance P and immunoregulation.  
Federation Proc. 1987;46:196-199.

**McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM.**

Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during inflammatory response to a broad spectrum of stimuli.  
J Exp Med. 1996;184:2429-2432.

**McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG.**

Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces.  
J Exp Med. 1994;179:1331-1336.

**Mitchell RA, Herbert DA, Baker DG, Basbaum CB.**

In vivo activity of tracheal parasympathetic ganglion cells innervating tracheal smooth muscle.  
Brain Res. 1987;437:157-160.

**Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwsen CG.**

Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: Downregulation by inhaled corticosteroids.  
Clin Exp Allergy. 1996;26:517-524.

**Moser M, Murphy KM.**

Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development.  
Nat Immunol. 2000;1:199-205.

**Myers AC, Kajekar R, Udem BJ.**

Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2002;282:L775-781.

**Myers AC, Udem BJ.**

Antigen depolarizes guinea pig bronchial parasympathetic ganglion neurons by activation of histamine H1 receptors.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 1995;268:879-884.

**Myers AC, Udem BJ, Kummer W.**

Anatomical and electrophysiological comparison of the sensory innervation of bronchial and tracheal parasympathetic ganglion neurons.  
J Auton Nerv Syst. 1996;61:162-168.

**Myers AC, Udem BJ, Weinreich D.**

Electrophysiological properties of neurons in guinea-pig bronchial parasympathetic ganglia.  
Am J Physiol. 1990;259:403-409.

**Myers AC, Udem BJ, Weinreich D.**

Influence of antigen on membrane properties of guinea pig bronchial ganglion neurons.  
J Appl Physiol. 1991;71:970-976.

**Myers AC, Weinreich D, Udem BJ.**

A reidentifiable parasympathetic ganglion on the bronchus of the guinea pig: anatomical and electrophysiological characteristics.  
Fedn Am Socs exp Biol J. 1988;2:A1056-

**Nadel JA.**

Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways.  
Eur Respr J. 1990;645-651.

**Olsson Y.**

Topographical differences in the vascular permeability of the peripheral nervous system.  
Acta Neuropathol. 1968;10:26-33.

**Partanen M, Laitinen A, Hervonen A, Toivanen M, Laitinen LA.**

Catecholamine and acetylcholinesterase containing nerves in human lower respiratory tract. Histochemistry. 1982;76:175-188.

**Payan DG.**

Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. P J Immunol. 1983;131:1613-1615.

**Payne AN, De Nucci G.**

Anaphylaxis in guinea pigs induced by ovalbumin aerosol. In vivo and in vitro methods. J Pharmacol Methods. 1987;17:83-90.

**Perry VH, Lawson LJ.**

Macrophages in the central nervous system. University Press, Oxford. 1992;392-413.

**Pichavant M, Tillie-Leblond I, Pestel J.**

Production of chemokines by allergen-stimulated bronchial epithelial cells induces the recruitment of dendritic cell precursors. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:482-

**Portanova JP, Christine LJ, Rangwala SH, Compton RP, Hirsch JL, Smith WG.**

Rapid and selective induction of blood eosinophilia in guinea pigs by recombinant human interleucin 5. Cytokine. 1995;7:775-783.

**Poynter ME, Irvin CG, Janssen-Heininger YMW.**

Rapid activation of nuclear factor-KappaB in airway epithelium in a murine model of allergic airway inflammation. Am J Pathol. 2002;160:1325-1334.

**Reid PA, Watts C.**

Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. Nature. 1990;345:655-657.

**Rescigno M, Urbano M, Valzasina B.**

Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nat Immunol. 2001;2:361-367.

**Riberdy JM, Newcomb JR, Surman M, Barbosa JA, Cresswell P.**

HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. Nature. 1992;360:474-477.

**Riccio MM, Kummer W, Biglari B, Myers AC, Udem BJ.**

Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways. J Physiol. 1996;496.2:521-530.

**Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N.**

Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. Science. 1999;283:1183-1186.

**Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austin JM.**

Dendritic cell loss from non lymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor and interleucin 1. J Exp Med. 1995;181:2237-2247.

**Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST.**

Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol.* 1999;162:2472-2475.

**Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.**

Dendritic cell use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 1995;182:389-400.

**Santambrogio L, Sato AK, Carven GJ, Belyanskay SL, Strominger JL, Stern LJ.**

Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1999b;96:15056-15061.

**Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG, Holt PG.**

Studies on the density distribution and surface phenotype intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen(Ia)-bearing dendritic cells in the conducting airways. *J Exp Med.* 1991;173:1345-1356.

**Schwartz LB.**

Mast cells: function and contents. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:91-97.

**Sheppard MN, Kurian SS, Henzen Logmans SC, Michetti F, Cocchia D, Cole P, Rush RA, Marangos PJ, Bloom SR, Polak JM.**

Neuron-specific enolase and S-100. New markers for delineating the innervation of the respiratory tract in man and other animals. *Thorax.* 1983;38:333-340.

**Shimeld C, Whiteland JL, Nicholls SM, Grinfeld E, Easty DL, Gao H, Hill TJ.**

Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. *J Neuroimmunol.* 1995;61:7-16.

**Silberberg-Sinakin I, Thorbecke GJ, Baer RL, Rosenthal SA, Berezowsky V.**

Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes. *Cell Immunol.* 1976;25:137-151.

**Skofitsch G, Savitt JM, Jacobowitz DM.**

Suggestive evidence for a functional unit between mastcells and substance P fibers in rat diaphragm and mesentery. *Histochemistry.* 1985;82:5-8.

**Smith H.**

Animal models of asthma. *Pulm Pharmacol.* 1989;2:59-74.

**Smith RV, Satchell DG.**

Extrinsic pathways of the adrenergic innervation of the guinea pig trachealis muscle. *J Auton Nerv Syst.* 1985;14:61-73.

**Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A.**

Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model of their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161:1083-1086.

**Stacey MA, Sunday G, Vassali G.**

The allergen Der p1 induces NF-kappaB activation through interference with IkappaB alpha function in asthmatic bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:522-526.

**Stahl PD, Ezekowitz RA.**

The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense.  
Curr Opin Immunol. 1998;10:50-55.

**Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J.**

Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferation by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and spleen.  
J Immunol. 1986;136:152-156.

**Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD.**

Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation.  
J Neurocytol. 1989;18:671-683.

**Szelenyi I.**

Animal models of bronchial asthma.  
Inflamm Res. 2000;49:639-654.

**Takeda K, Haczku A, Lee JJ.**

Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung.  
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2001;281:L394-L402.

**Temelkovski J, Hogan SP, Sherped DP, Foster PS, Kumar RK.**

An improved murine model of asthma: Selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolized allergen.  
Thorax. 1998;53:849-856.

**Ten Berge RE, Santing RE, Jan Hamstra J, Roffel AF, Zaagsma J.**

Dysfunction of muscarinic M2 receptors after the early allergic reaction: Possible contribution to bronchial hyperresponsiveness in allergic guinea pigs.  
Br J Pharmacol. 1995;114:881-887.

**Torii H, Hosoi J, Beissert S, Xu S, Fox FE, Asahina A, Takashima A, Rook AH, Granstein RD.**

Regulation of cytokine expression in macrophages and the langerhans cell-like XS52 by calcitonin gene-related peptide.  
Leuk Biol. 1997;61:216-223.

**Turley SJ, Inaba K, Garrett WS.**

Transport of peptide-MHC Class II complexes in developing dendritic cells.  
Science. 2000;288:522-527.

**Undem BJ, Hubbard WC, Christian EP, Weinreich D.**

Mast cells in the guinea pig superior cervical ganglion: a functional and histological assessment.  
J Auton Nerv Syst. 1990;30:75-88.

**Undem BJ, Hunter DD, Liu MC, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A.**

Allergen induced sensory neuroplasticity in airways.  
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1999;118:150-153.

**Undem BJ, Myers AC, Weinreich D.**

Antigen-induced modulation of autonomic and sensory neurons in vitro.  
Int Arch Allergy Appl Immunol. 1991;94:319-324.

**Underwood S, Foster M, Raeburn D, Bottoms S, Karlsson JA.**

Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guinea pig and its relationship to airway hyperresponsiveness.  
Eur Resp J. 1995;8:2104-2113.

**Usui M, Aoki I, Sunshine GH, Dorf ME.**

A role for macrophages in suppressor cell induction.  
J Immunol. 1984;132:1728-1734.

**van den Heuvel MM, Vanhee DD, Postmus PE.**

Functional and phenotypic differences of monocyte-derived dendritic cells from allergic and nonallergic patients.  
J Allergy Clin Immunol. 1998;101:90-95.

**Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA.**

Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes.  
J Exp Med. 2001;193:51-60.

**Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA.**

Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction.  
J Immunol. 2000;164:4507-4512.

**Wan H, Winton HL, Soeller C.**

Der P1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions.  
J Clin Invest. 1999;104:123-133.

**Wasserman SI.**

Mast cells and airway inflammation in asthma.  
Am J Respir Crit Care Med. 1994;150:39-41.

**Watts C.**

Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.  
Annu Rev Immunol. 1997;15:821-850.

**Weinreich D, Udem BJ.**

Immunological regulation of synaptic transmission in isolated guinea pig autonomic ganglia.  
J Clin Invest. 1987;79:1529-1532.

**Weiss JM, Sleeman AC, Dittmar H, Termeer CC, Taxis S, Howells N, Hofmann M, Kohler G, Schopf E, Ponta H, Herrlich P, Simon JC.**

An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function.  
J Cell Biol. 1997;137:1137-1147.

**Wollenberg A, Wen S, Bieber T.**

Langerhans cell phenotyping: a new tool for differential diagnosis of inflammatory skin diseases.  
Lancet. 1995;346:1626-1627.

**Wulfing C, Davis MM.**

A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation.  
Science. 1998;282:2266-2269.

**Xia W, Pinto CE, Kradin RL.**

The antigen-presenting activities of Ia<sup>+</sup> dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen.  
J Exp Med. 1995;181:1275-1283.

**Yost BL, Gleich GJ, Fryer AD.**

Ozone-induced hyperresponsiveness and blockade of M2 muscarinic receptors by eosinophil major basic protein.  
J Appl Physiol. 1999;87:1272-1278.

**Zhang C, Zhou Z.**

Ca<sup>2+</sup>-independent but voltage-dependent secretion in mammalian dorsal root ganglion neurons.  
Nat Neurosci. 2002;5:425-430.

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveoläre Lavage
CCR	chemokine receptor
CD	cluster of differentiation
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CK	Chemokin
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICAM-1	Adhäsionsmolekül 1
Ig	Immunglobulin
IL-1	Interleukin 1
MIP	macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NF	Neurofilamentprotein
NGF	nerve growth factor
NKA	Neurokinin A
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NSS	normales Schweineserum

PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAR-2	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGP 9.5	protein-gene-product 9.5
PPT	Präprotachykinin
RNA	Ribonukleinsäure
Rr.	Rami
SP	Substanz P
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid

## **Danksagung**

An dieser Stelle danke ich Herrn Professor Axel Fischer für die Überlassung des Themas und die Betreuung des experimentellen Teils der Arbeit.

Herrn Professor Wolfgang Kummer möchte ich sehr herzlich für die wertvollen Ratschläge und Fachgespräche sowie für seine persönliche Unterstützung und Förderung meinen besonderen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt auch Tamara Papadakis, Silke Wiegand, Karola Michael und Martin Bodenbenner für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Laborarbeiten.

Danken möchte ich auch meinem Freund Oliver und unserer Tochter Lilli für ihr energisches Motivieren und die liebevolle Zuwendung.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Ulrike Brenner  
Geburtsdatum und –ort: 08.01.1974 in Mönchengladbach  
Anschrift: Wartweg 35 B  
35392 Gießen  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### **Schulische Ausbildung**

08/1980 – 06/1984 Grundschule Burgbongert, Odenkirchen  
08/1984 – 05/1993 Gymnasium Odenkirchen, Abschluß Abitur

### **Freiwilliges soziales Jahr**

08/1993 – 02/1994 Stiftsklinik Augustinum, München

### **Studium**

04/1994 – 05/2001 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
08/1997 1. Staatsexamen  
04/2000 2. Staatsexamen  
05/2000 – 04/2001 Praktisches Jahr:  
Chirurgie, Ev. Krankenhaus, Giessen  
Gynäkologie und Geburtshilfe, Asklepios Klinik, Lich  
Innere Medizin, Ev. Krankenhaus, Giessen  
05/2001 3. Staatsexamen

### **Beruf**

07/2001 – 12/2002 Ärztin im Praktikum  
Frauenklinik, Universitätsklinikum Gießen  
seit 01.01.03 Assistenzärztin  
Frauenklinik, Universitätsklinikum Gießen

## Summary

Interactions between the immun- and nervous system are important for the regulation of the airways under normal conditions and for allergic inflammatory diseases like bronchial asthma.

DC stand at the beginning of the immune response, they are necessary for presentation of antigens. DC are not only responsible for the direct allergic reaction but also for the late onset reaction that begins after a maximum of 24 hours (Lambrecht et al. 1998). It is well known that DC are located in close spatial relationship to neurons. Sensory neurons release from their perikarya neuropeptides such as CGRP (Huang et Neher 1996) that can attract DC (Dunzendorfer et al. 2001). This study investigates if such a close spatial relationship between DC and nervous system exists for the airways, too, and if DC in ganglia of the airway innervation undergo similar changes as mucosal DC in the course of allergic-inflammatory disease.

As a model for bronchial asthma we used guinea pigs that were sensitized against ovalbumin and were challenged once with ovalbumin inhalation. Using frozen sections of the lung and sensory ganglia of vagus, DC were labelled by indirect immunohistochemistry with a monoclonal antibody against major histocompatibility complex class II, and neurons with a polyclonal antiserum against protein gene product 9.5. DC were quantified in the bronchial mucosa, in local ganglia of the airways and in sensory ganglia of the vagus nerve (ganglion nodosum) in each experimental group. These groups included: intraperitoneal injection and ovalbumin challenge (experimental group 1), inhalative ovalbumin exposition without sensitisation (group 2), and intraperitoneal ovalbumin injection without challenge (group 3).

In this guinea pig model, allergen challenge after sensitisation leads nearly to a doubling of DC number per defined mucosal area. This investigation is the first to identify DC in local airway ganglia with a number of 0.4 DC per neuron. This relation does not change significantly after sensitisation or sensitisation and allergen provocation. In the sensory nodose ganglion, however, that is located in the course of the vagus nerve below the base of the skull, the relative number of DC is less than in local ganglia, accounting to about 0.1 per neuron. In contrast to local airway ganglia,

sensitisation and inhalative allergen challenge lead to an increase of DC to a level of about 0.3 DC per neuron in this sensory vagal ganglion.

The increase of DC in the bronchial mucosa of sensitised and challenged animals after provocation by allergen is in accord to values reported by other authors (Lawrence et al. 1997). By now, the existence of DC in guinea pig sensory ganglia was unknown. Neuroanatomical tracing techniques have shown in the 90<sup>th</sup> that, in guinea pig, 10 % of nodose neurons projecting to the airways contain tachykinins as well as CGRP after sensitisation and antigen challenge whereas this peptide is absent in these neurons under control conditions and after allergen exposure following prior vehicle instead of antigen injection (Kummer et Fischer 1995). The increase of CGRP synthesis in the nodose ganglion after sensitisation and provocation with allergen and the following release of CGRP from neuronal perikaryon could be responsible for the increased occurrence of DC in group 1. Until now, there was no report on the occurrence of DC in guinea pig local parasympathetic ganglia of the airways where acetylcholine is the main transmitter. Here, in contrast to the nodose ganglion, neuronal perikarya do not contain CGRP. There are, however, CGRP containing nerve fibres in these local airway ganglia (Kummer 1992), but they originate from the jugular or spinal ganglia whose airway afferents differ functionally anatomically from those of the nodose ganglion (Riccio et al. 1996). An increase in immunoreactivity for neuropeptides during allergic airway inflammation, as seen for the irritant receptors of the nodose ganglion, has not been observed in jugular neurons (Kummer et Fischer 1995). Moreover, CGRP release from nerve endings is an entirely different process compared to the release from cell bodies in the nodose ganglion (Huang et Neher 1996). Whereas the functional meaning of DC in ganglia of airway innervation is still unclear, the quantitative changes in the nodose ganglion after sensitisation and allergen challenge point to their involvement in the allergy-induced alterations that occur in the vagal sensory ganglia.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich – Ulrike Brenner, wohnhaft Wartweg 35b in Giessen, geb. am 08.01.1974 – erkläre, ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Giessen, im Januar 2005

Ulrike Brenner