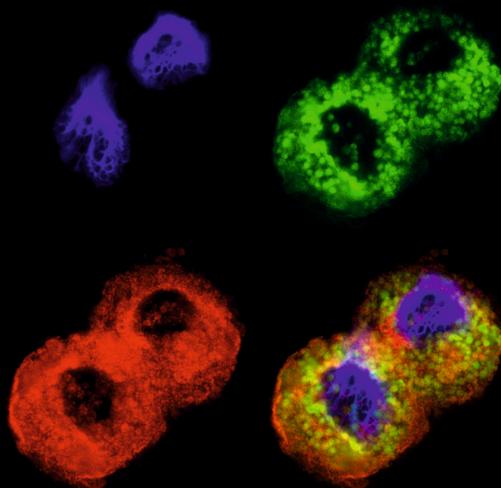


Frank Risto Rommel

Über den Einfluss von Stress und Entzündung
auf das non-neuronale cholinerge System
und die Mastzellen der Haut



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Über den Einfluss von Stress und Entzündung
auf das non-neuronale cholinerge System
und die Mastzellen der Haut**

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

Frank Risto Rommel

aus Hanau

Gießen 2015

Aus der Klinik für Psychosomatik und Psychotherapie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Johannes Kruse

Gutachter: PD Dr. med. Eva Peters

Gutachter: Prof. Dr. med. Eberhard Weihe

Tag der Disputation: 15.06.2016

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wissenschaftlicher Hintergrund	1
1.2	Stress	2
1.2.1	Entwicklung der Stresstheorie	2
1.2.2	Stressoren und Stressmediatoren	3
1.2.2.1	Die sympathische Achse und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse	4
1.2.2.2	Die Rolle der Neuropeptide und Neurotrophine in der Stressreaktion	5
1.2.2.3	Das neuronale und non-neuronale cholinerge System	7
1.3	Die Haut	8
1.3.1	Der Aufbau der Haut	8
1.3.2	Gefäße, Nervenfasern und Mastzellen	9
1.3.3	Die allgemeinen Funktionen der Haut	10
1.3.4	Die Haut als aktives Organ des Immunsystems	11
1.3.5	Neuroendokrine-immune Interaktion	14
1.4	Atopische Dermatitis	16
1.4.1	Klinik	16
1.4.2	Pathogenese und Immunologie	17
1.4.3	Zusammenhang der Atopischen Dermatitis mit psychischer Belastung und Stress	17
1.5	Mastzellen im Zentrum von Entzündung und Stress	19
1.5.1	Entdeckung, Herkunft und Differenzierung	19
1.5.2	Rezeptoren, Aktivierung und Mediatoren	19
1.5.3	Die Mastzelle als Schlüsselspieler der Immunantwort	21
1.5.4	Die Rolle der Mastzellen in der Atopischen Dermatitis	22
1.6	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Materialien	26
2.1.1	Tiere	26
2.1.2	Instrumente	27
2.1.3	Labormaterialien	28
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.5	Kits	30
2.1.6	Medien	31
2.1.7	Puffer und Lösungen	31
2.1.8	Primäre Antikörper	32
2.1.9	Sekundäre Antikörper	33

2.1.10	Blockpeptide	33
2.1.11	Primer	34
2.1.12	Software.....	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Das AID-Stress-Modell	36
2.2.1.1	Entnahme der Gewebeprobe.....	38
2.2.2	Weitere Organentnahmen	38
2.2.3	Genotypisierung.....	38
2.2.4	Peritoneale Mastzellkultur.....	39
2.2.4.1	Gewinnung der Mastzellen	39
2.2.4.2	Kultivierung der Mastzellen.....	39
2.2.4.3	Zellernte.....	40
2.2.4.4	Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.4.5	Bestimmung der Reinheit	41
2.2.4.6	Behandlung der Mastzellen	42
2.2.4.7	Gewinnung der behandelten Mastzellen	42
2.2.5	RNA-Isolation.....	43
2.2.6	Gelelektrophorese	43
2.2.6.1	Gelherstellung.....	43
2.2.6.2	Durchführung der Gelelektrophorese	43
2.2.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	44
2.2.8	Microarray-Analyse.....	44
2.2.9	DNA-Verdau und cDNA-Synthese.....	44
2.2.9.1	DNA-Verdau	44
2.2.9.2	cDNA-Synthese	45
2.2.10	Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.10.1	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	45
2.2.10.2	Expressionsanalyse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion	46
2.2.11	Histochemie	47
2.2.11.1	Herstellung der Zytospins	47
2.2.11.2	Giemsa Färbung	47
2.2.12	Immunhistochemie.....	47
2.2.12.1	Herstellung der Gewebeschnitte.....	48
2.2.12.2	Immunfluoreszenzfärbung	48
2.2.13	Statistische Analyse.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiertes Gene in der Haut: Microarray-Analyse.....	50

3.2	Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiertes Gene in der Haut: qPCR	52
3.2.1	Acetylcholin-Stoffwechsel	52
3.2.2	Acetylcholin-Rezeptoren	55
3.2.3	Endogener nAChR α 7-Ligand SLURP1	56
3.3	Stress steigert die Acetylcholin- und Cholin-Konzentration in der AID	57
3.4	Veränderte Expression TH1- und TH2-spezifischer Zytokine und assoziierter Rezeptoren unter Stress und AID	59
3.5	Mastzellen sind Teil des kutanen non-neuronalen cholinergen Systems	63
3.6	Stress und AID beeinflussen die ChAT-Expression in kutanen Mastzellen ..	65
3.7	Stress steigert die Expression des nAChR α 7 in Mastzellen	66
3.8	Veränderte Expression TH1- und TH2-spezifischer Zytokine in kutanen Mastzellen	68
3.9	Mastzellproteasen	71
3.9.1	Gesteigerte Expression der Mastzellprotease 4 in der AID	71
3.9.2	Der nAChR α 7 ist in die Expression der Mastzellprotease 4 involviert	74
3.9.3	Stress reguliert die Mastzellprotease 4 in der AID herunter	75
4	Diskussion	77
4.1	Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiertes Gene in der Haut: Microarray-Analyse	77
4.2	Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiertes Gene in der Haut: qPCR	78
4.3	Acetylcholin reagiert auf Stress in der AID	80
4.4	Regulation cholinerges Zielstrukturen in der Haut	82
4.4.1	Zytokine werden unter Stress und Entzündung reguliert	82
4.4.2	Zytokinrezeptoren tragen zur TH2-Dominanz bei	85
4.5	NGF und BDNF beeinflussen das NNCS und dessen Zielstrukturen	86
4.6	Mastzellen sind ein aktiver Teil des non-neuronalen cholinergen Systems ..	88
4.6.1	Mastzellen verändern ihre ChAT-Expression in der AID	88
4.6.2	Der nAChR α 7 der Mastzellen schützt in der AID	90
4.6.3	Mastzell-Zytokine schützen in der AID, fördern diese aber unter Stress	91
4.6.4	Fazit der Mastzellanalyse im Rahmen des NNCS	91
4.7	Mastzellproteasen spielen eine komplexe Rolle in der Interaktion von Stress und AID	92
4.7.1	Entzündungshemmende Hochregulation der Mastzellprotease 4 in der AID	92
4.7.2	Der nAChR α 7 stabilisiert die MZP4-Expression in Mastzellen	93
4.7.3	NGF-abhängige Blockade der Mastzellprotease 4 molekularer Ebene	95
4.7.4	Untergeordnete Rolle der Mastzellprotease 6 in der AID	96

4.7.5	Schlussfolgerung Mastzellproteasen	97
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick	98
5	Zusammenfassung	99
6	Summary	100
	Abkürzungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis	V
	Literaturverzeichnis	VII
	Publikationsverzeichnis	XXIII
	Ehrenwörtliche Erklärung	XXIV
	Danksagung	XXV
	Lebenslauf	XXVI

1 Einleitung

In der hier vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit soll der Einfluss von Stress auf chronische Hauterkrankungen am Beispiel der Atopischen Dermatitis (AD) untersucht werden. Der Schwerpunkt wird hierbei auf dem non-neuronalen cholinergen System (NNCS) liegen. Um eine generelle Idee über eine stressabhängige Regulation des kutanen NNCS zu erhalten, wird zunächst an einem murinen Tiermodell, dem sog. Atopischer Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis (AID)-Stress-Modell, eine Microarray-Analyse durchgeführt, anschließend werden die NNCS-relevanten Marker auf molekularer Ebene untersucht. Des Weiteren werden kutane Mastzellen (MZ) auf ihre Zugehörigkeit und Rolle innerhalb des NNCS immunhistochemisch untersucht und im Rahmen einer Mastzellkultur der Zusammenhang des NNCS mit der Expression der Stressmediator-verdauenden Mastzellproteasen (MZP) analysiert.

1.1 Wissenschaftlicher Hintergrund

Mit der Einführung des Begriffes „Stress“ Mitte des 20. Jahrhunderts rückte dieser zunehmend in den Fokus der modernen Medizin. Wissenschaftliche Untersuchungen haben gezeigt, dass Stress Einfluss auf die Gesundheit eines Organismus haben kann [1-3]. Als Ursache für diese Beobachtung wird die Aktivierung von Stressachsen und die Abgabe unterschiedlicher Stressmediatoren, welche mit dem Immunsystem interagieren, angenommen [4, 5]. In den vergangenen Jahren konnten sowohl Tier- als auch Humanstudien zeigen, dass Stress Einfluss auf die Homöostase, Entzündungen, und das Immunsystem von grenzbildenden Organen, beispielsweise der Haut, hat [6-11]. Dabei trug die AD maßgeblich zum Verständnis der grundlegenden Mechanismen und der neuroendokrinen-immunologischen Kommunikation bei [9, 10, 12, 13]. Viele Studien fokussierten sich dabei auf die Beobachtung, dass Stress zu einer Verschlechterung der AD führt und zeigten Zusammenhänge mit den beiden bekanntesten Stressachsen, der sympathischen Achse (SA) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA), auf [14-19]. Zusätzlich werden aber auch Neuropeptide (NP) und Neurotrophine (NT) durch Stress reguliert und fördern eine neurogene Entzündung in der AD [12, 13, 20]. Der entstehende Phänotyp wird bei Patienten häufig als belastend empfunden und interagiert mit der psychosozialen Gesundheit [21, 22].

In den vergangenen Jahren lag das Interesse in der Erforschung des NNCS, welches als ein möglicherweise neues, in die Stressreaktion involviertes System, verstanden werden kann. Untersuchungen zeigten, dass der entscheidende Neurotransmitter

Acetylcholin (ACh) nicht nur von Nervenfasern (NF) freigesetzt, sondern auch non-neuronal synthetisiert und abgegeben werden kann [23].

Die AD ist eine chronische Hauterkrankung in deren immunologische und inflammatorische Prozesse MZ involviert sind. Diese sind bis heute vor allem für ihre Rolle in entzündlichen und allergischen Reaktionen bekannt. Gleichzeitig können MZ aktiv in Immunreaktionen eingreifen und diese auch anti-inflammatorisch modulieren [24]. Ermöglicht wird dies durch ein großes Repertoire an Rezeptoren und durch die Abgabe spezifischer Mediatoren, insbesondere Zytokine, NP, NT und MZP [25-30]. Gleichzeitig spalten sie Zytokine und NP und interagieren mit NT [27]. Sie greifen somit aktiv in die Stress- oder Immunreaktion ein und können deren Verlauf beeinflussen [28, 31, 32].

1.2 Stress

Der Begriff „Stress“ (engl. für Druck, Anspannung; lat. stringere, anspannen) wird in der heutigen Zeit vor allem mit negativen Ereignissen und Gefühlen assoziiert, dient aber auch als Antrieb zur Bewältigung anstehender Aufgaben. Geprägt wurde die Verwendung des Begriffs „Stress“ von Hans Selye, der diesen Mitte des 20. Jahrhunderts aus der Physik entlehnte und ihn erstmals im biologischen Zusammenhang als körperlichen Zustand unter Belastung definierte. Eine moderne Definition von Stress beschreibt diesen als eine durch verschiedene Stimuli (Stressoren) ausgelöste physiologische Reaktion, die unterschiedliche Stresssysteme aktiviert (Stressreaktion). Ein Stressor leitet eine Stressreaktion ein, die zur Bewältigung des Stressors beiträgt. Gleichzeitig kann Stress auch als körperlich oder psychisch belastend empfunden werden.

1.2.1 Entwicklung der Stresstheorie

Den Grundstein der modernen Stressforschung legte bereits Claude Bernard im 19. Jahrhundert. Mit dem von ihm geprägten Begriff des „Milieu intérieur“ (inneres Milieu) beschreibt er, dass das Überleben eines Organismus von der Aufrechterhaltung seines inneren Milieus abhängt. Zwar bezog Bernard umweltbedingte Einflüsse nicht in seine Überlegungen ein, war jedoch durch seine Begriffsdefinition für das später durch Walter Cannon postulierte Konzept der Homöostase mitverantwortlich [33, 34].

Walter Cannon gilt als Begründer der „Fight or Flight“-Reaktion („Kampf oder Flucht“-Reaktion), welche die umgehende körperliche und seelische Anpassung eines Organismus in Gefahrensituationen als Stressreaktion beschreibt [35]. Bereits 1915 entdeckte er eine Steigerung der Herz- und Atemfrequenz sowie des Muskeltonus in

Abhängigkeit von einer gesteigerten AdrenalinKonzentration im Blut [36]. Der von ihm beschriebene Mechanismus stellt die Geburtsstunde der heute etablierten SA dar. Cannon ging in seinen Überlegungen davon aus, dass der Anstieg der AdrenalinKonzentration nur unter Stress messbar sei. Später zeigte sich, dass auch alltägliche Situationen, wie das Verdauen von Nahrung oder freies Sprechen vor einem Publikum Veränderungen in diesem System auslösen, obwohl sie nicht als Gefahren für das Leben einzustufen sind [37, 38]. Wenige Jahre später prägte er den Begriff der Homöostase. Mit diesem beschreibt er die Aufrechterhaltung des Status quo anhand festgelegter Sollwerte und Sensoren innerhalb variabler Grenzen physiologischer Parameter, wie u.a. Blutdruck und Blutzucker [39].

Hans Selye gilt als bekanntester Wegbereiter der bis heute andauernden wissenschaftlichen Auseinandersetzung mit Stress. Er definierte Stress als unspezifische Reaktion des Körpers auf jede Anforderung, sei sie positiv oder negativ [40]. Er war der Meinung, dass der Körper zwar spezifisch auf bestimmte Anforderungen reagieren könne, aber diese Reaktion auch immer unspezifische Veränderungen zur Folge habe. Diese fasste er unter dem Begriff des „generellen Adaptationssyndrom“ zusammen, welches er in drei Phasen einteilte: Alarm-, Widerstands- und Erschöpfungsphase [41, 42]. Schon damals postulierte Selye die bis heute akzeptierte Aussage, dass chronischer Stress in einer Erschöpfung der Stressantwort und Schädigung des Organismus resultiert. Die Basis seiner Theorie bildete die Entdeckung der HHNA. In Anlehnung an den von Cannon etablierten Begriff der Homöostase prägte Selye den Begriff der Heterostase. Er nahm an, dass die Sollwerte eines Systems dynamisch an die jeweiligen Bedingungen angepasst werden können, um so auch gegen starke und anhaltende Stressoren zu bestehen [43].

Bis heute werden Stress-Konzepte weiterentwickelt. Chrousos et al. nahmen an, dass jeder Stressor, wenn er stark genug ist, eine unspezifische Stressantwort auslöst [44]. Später wurde der von Selye eingeführte Begriff der Heterostase durch den Begriff der Allostase ersetzt. Diese beschreibt physiologische und psychologische Anpassungen des Körpers unter Stress, die auch zukünftige Stressoren einbeziehen, um so die Gesundheit des Körpers aufrechtzuerhalten. In diesem Konzept spielt vor allem das Gehirn als wahrnehmendes und auswertendes Organ eine entscheidende Rolle [45-47].

1.2.2 Stressoren und Stressmediatoren

Alle inneren und äußeren Reize, die auf einen Organismus einwirken und eine Anpassungsreaktion auslösen, werden unter dem Begriff „Stressoren“ zusammengefasst. Stressoren können nach unterschiedlichen Kriterien eingeteilt

werden. Exogene Stressoren, wie Wärme, Kälte, UV-Strahlung, Chemikalien, Druck, Verletzungen, Entzündungen, Bakterien, Parasiten und Pilze wirken meist unmittelbar, selbstständig und lokal auf exponierten Organen wie der Haut, der Lunge oder dem Darm [48-51]. Als sogenannte endogene Stressoren werden emotionale, akustische, soziale und psychische Belastungen sowie psychische Erkrankungen verstanden. Diese werden über das Gehirn wahrgenommen, verarbeitet und lösen in der Folge eine biologische Stressreaktion aus. Nur so können sie auch auf das Gehirn oder den gesamten Organismus wirken. Auch chronische Erkrankungen, wie die AD, interagieren mit der psychosozialen Gesundheit und können gleichzeitig als exogene und endogene Stressoren agieren [52, 53].

Der Einfluss von Stressoren auf einen Organismus hängt nicht nur von deren Art, sondern auch von deren Wirkdauer ab. Als „akuter Stress“ wird ein Zeitraum von Minuten (Min.) bis Stunden (Std.) angesehen. „Chronischer Stress“ hingegen wird als sich wiederholender Stress oder als Zeitraum von mehreren Std. bis hin zu Monaten definiert [54]. Typisch für akuten Stress ist eine schnelle physiologische Reaktion des Organismus, die nach Bewältigung des Stressors beendet wird. Chronischer Stress hingegen resultiert in einer anhaltenden Stressreaktion, obwohl der Stressor bereits überwunden wurde oder führt zu wiederholten Aktivierungen des Stresssystems [55]. Generell hat die Dauer des Stressors auch einen Einfluss auf die Folgen innerhalb des Organismus: Akuter Stress ist vor allem für seine protektiven Effekte bekannt, chronischer Stress hingegen für seinen schädigenden Einfluss [54].

Die Antwort des Körpers besteht in einer physiologischen Stressreaktion mit dem Ziel, den Stress zu kontrollieren und zu steuern. Folglich kommt es zu einer Aktivierung unterschiedlicher Stressachsen und zur Freisetzung von Hormonen, Neurotransmittern, NP, NT und Zytokinen innerhalb des Blutkreislaufes, aber auch lokal innerhalb von Organen. Zu den bekanntesten Stressachsen gehören die SA und HHNA, aber auch NT, NP und das cholinerge System (CS) werden durch Stress beeinflusst [8, 14, 56-58].

1.2.2.1 Die sympathische Achse und Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse

Die Grundlage der SA bildet das autonome Nervensystem. Die Schlüsselspieler sind Adrenalin und Noradrenalin. Beide werden aktiv durch die Nebennieren sezerniert, stehen aber auch durch NF des sympathischen Nervensystems in direktem Kontakt mit peripheren Organen und deren Zellen. Die SA bildet die Grundlage einer funktionierenden „Fight or Flight“-Reaktion, da sie direkten Einfluss auf das

kardiovaskuläre, respiratorische, muskuläre, gastrointestinale und endokrine System besitzt [59]. Zusätzlich besitzt sie Einfluss auf das Immunsystem (siehe 1.3.5) [60].

Die Aktivierung der HHNA erfolgt durch den Hypothalamus. Es folgt die Abgabe des *corticotropin-releasing hormone* (CRH), welches den Regulator dieser Achse bildet [61, 62]. CRH gelangt durch Blutgefäße direkt zum Vorderlappen der Hypophyse und bindet dort an spezifische CRH-Rezeptoren. Deren Aktivierung leitet die Sekretion des adrenocortikotropen Hormons in den systemischen Blutkreislauf ein und stimuliert die Synthese und Sezernierung von Glukokortikoiden in der Nebennierenrinde. Zusätzlich konnte in der Haut die lokale Sekretion von CRH durch NF und Immunzellen nachgewiesen werden [63, 64]. Heute sind viele immunologische Effekte der HHNA bekannt. Je nach Sekretion wirkt sie systemisch oder lokal und leitet so eine optimale Immunantwort ein. Bei Depressionen oder in der AD konnte eine gesteigerte oder verminderte Aktivierung dieser Stressachse nachgewiesen werden [65-67].

1.2.2.2 Die Rolle der Neuropeptide und Neurotrophine in der Stressreaktion

Seit der Entdeckung der NP und NT sammeln sich die Hinweise, dass diese, insbesondere Substanz P (SP), *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), eine wichtige Rolle im Rahmen der Stressantwort spielen und eine mögliche weitere Stressachse angenommen werden kann. Die Aktivierung dieser Achse erfolgt immer parallel mit den oben beschrieben bekannten Stressachsen und hängt von NF und der NP- und/oder NT-Sekretion ab.

Die NP bilden eine große Gruppe unterschiedlicher Peptide, die vor allem im Gehirn, aber auch in fast jedem anderen Gewebe des Körpers produziert werden. Sie werden in der Haut durch peptiderge NF und MZ sezerniert [68, 69]. Gleichzeitig wirken sie durch spezifische Neurokinin-Rezeptoren (NKR) auf deren Oberflächen [70]. Das Vorhandensein der Rezeptoren auf Immunzellen, z.B. MZ, und deren Nähe zu NF ermöglicht es, dass NP als Mediatoren auf das Immunsystem wirken [71, 72]. Das wichtigste NP im Rahmen der neuroendokrinen-immunen Interaktion ist SP.

SP wurde 1931 von Euler entdeckt [73]. Es wird im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Im Gehirn agiert es als Neurotransmitter und bindet spezifisch an NKR1. NKR1 wird in für die Stresswahrnehmung relevanten Arealen des Gehirns exprimiert, gleichzeitig aber auch durch Zellen der Haut oder des Immunsystems [74]. Im Gehirn nimmt SP Einfluss auf die Funktion der SA und HHNA und liegt unter Stress in erhöhten Konzentrationen vor. In der Peripherie ist SP in sensorischen, peptidergen NF zu finden. Reagiert der Körper auf Stress, wird durch unterschiedliche Stimuli, wie

Einleitung

Histamin oder Leukotriene, SP sezerniert und interagiert mit dem Immunsystem [58]. Gleichzeitig sind Zellen des Immunsystems, u.a. MZ, in der Lage SP zu produzieren.

NT bilden eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die ursprünglich im Nervengewebe entdeckt wurden. Zu ihnen werden NGF, BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, NT-6 und NT-7 gezählt [75-80]. NT interagieren mit verschiedenen Zellen innerhalb und außerhalb des Nervensystems, die spezifische, hochaffine Neurotrophin-Rezeptoren (NTR) exprimieren, sogenannte Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (Trk) [81]. NGF bindet dabei spezifisch an TrkA und BDNF spezifisch an TrkB [82]. Ebenso können sie an den NTR p75 binden. Dieser ist Teil der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) Familie, bindet alle NT mit geringer Affinität und interagiert mit den verschiedenen Trk [83].

Im Folgenden wird der Fokus auf NGF und BDNF liegen, da für diese Stressmediatoren Veränderungen in der Haut unter Stress und in AD nachgewiesen werden konnten [10, 84, 85].

Mit der Entdeckung von NGF vor mehr als 60 Jahren rückten NT zunehmend in den Fokus der Wissenschaft [80]. Untersuchungen zeigten, dass NGF als Chemokin agiert und für Wachstum, Aufrechterhaltung und Überleben sympathischer und sensorischer NF, sowohl zentral als auch peripher, entscheidend ist [86-88].

BDNF, erstmals durch Barde et al. entdeckt und isoliert, spielt eine entscheidende Rolle in der neuronalen Entwicklung im zentralen und peripheren Nervensystem [89]. Es fördert Überleben, Wachstum und Differenzierung der Neuronen [90].

NGF und BDNF werden nicht nur in neuronalen Geweben, sondern auch in peripheren Organen, wie der Haut, exprimiert [88, 91]. Zusätzlich zirkulieren sie im Blut und werden von einer Vielzahl unterschiedlicher non-neuronaler Zellen sezerniert [92-94]. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass sie auch eine Rolle in non-neuronalen Geweben spielen und als Signalstoffe zwischen dem Nerven- und Immunsystem dienen [95-97].

Die stressabhängige Sekretion von NGF und BDNF und die lokale Produktion konnten bereits für endogenen und mechanischen Stress nachgewiesen werden [98, 99]. Gleichzeitig exprimieren Zellen des Immunsystems NTR und nehmen durch Zytokine Einfluss auf die NGF Sekretion.

1.2.2.3 Das neuronale und non-neuronale cholinerge System

ACh wurde erstmals 1915 durch Henry Hallett Dale im Herzen entdeckt, wobei erst Otto Loewi die Funktion des ACh als Neurotransmitter identifizierte. Heute ist ACh der am besten beschriebene Neurotransmitter und vor allem für seine Funktion im zentralen, peripheren und autonomen Nervensystem bekannt. Er wird innerhalb cholinergischer Neurone produziert und in Reaktion auf physiologische Stimuli abgegeben. Synthetisiert wird ACh aus Cholin und Acetyl-CoA mit Hilfe des Enzyms Acetylcholintransferase (ChAT). Nach der Synthese wird ACh intrazellulär in Vesikeln gespeichert, dabei ist der vesikuläre Acetylcholintransporter (VAChT) von zentraler Bedeutung. Die Abgabe erfolgt mittels Exozytose. ACh wirkt durch spezifische nikotinerge und muskarinerge ACh-Rezeptoren (nAChR/mAChR). Neben ACh existieren weitere Liganden der nAChR, u.a. Secreted Ly-6/uPAR-related protein 1 (SLURP1) als spezifischer Ligand des nAChR α 7 oder das an nAChR α 3 bindende SLURP2 [100, 101]. Sowohl nAChR, als auch mAChR werden auch auf non-neuronalen Zellen, z.B. Immunzellen oder Keratinozyten, exprimiert [102, 103]. Der Abbau des ACh erfolgt durch die Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE), dabei besitzt die AChE den höheren Wirkungsgrad.

Neue Erkenntnisse zeigen, dass ACh unabhängig von NF durch nahezu jede lebende Zellen produziert werden kann [104]. Stammt das ACh nicht aus NF, spricht man vom NNCS. NNCS-relevante Schlüsselspieler, u.a. SLURP1 und ACh, können durch Zellen des Immunsystems und in Organen, wie der Haut, produziert werden [105-109]. ACh und SLURP agieren als Botenstoffe zwischen non-neuronalen Zellen, dem neuronalen System und äußeren Einflüssen, wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren [110-112]. Umgekehrt besitzen diese äußeren Faktoren Einfluss auf das NNCS, wie die Rolle von NGF auf die Expression der ChAT und TrkA zeigt [113]. Der Zyklus der ACh-Synthese, Lagerung und Sekretion im NNCS ist weitestgehend mit dem des neuronalen AChs vergleichbar. Untersuchungen zeigten, dass non-neuronal synthetisiertes ACh direkt durch organische Kationentransporter oder über eine Membranpore, genannt Mediatophor, abgegeben werden kann [114-117].

Über den Einfluss von Stress, insbesondere psychologischen Stress, auf das CS und NNCS, ist bisher wenig bekannt. Akuter Stress aktiviert das CS im Hippocampus und steigert die ACh-Konzentration sowie die Cholin-Aufnahme [56]. Gleichzeitig wird der Einfluss der HHNA auf das CS widersprüchlich diskutiert [56]. Chronischer Stress resultiert in einer verminderten Aktivität des zentralen CS und beeinflusst das Gedächtnis [118]. Bereits pränataler Stress hat Einfluss auf das CS [119]. Zusätzlich

konnte für das NNCS der Einfluss von psychologischem und entzündlichem Stress nachgewiesen werden, insbesondere in peripheren Organen wie der Haut [8, 120].

Andere Stressmediatoren, wie NGF und BDNF, haben Einfluss auf das CS. NGF kontrolliert dabei den cholinergen Genlokus von ChAT und VAcHT. Im Herzen konnte die Interaktion von BDNF und mAChR3 mittels der microRNA 376b-5p gezeigt werden [121].

1.3 Die Haut

1.3.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut (gr. derma; lat. cutis) ist durch ihre unterschiedlichen Aufgaben und Funktionen eines der vielseitigsten Organe des menschlichen Körpers. Mit 1,5–2,0 m² ist sie das größte Organ und bildet eine stetig mit der Umwelt in Kontakt stehende Begrenzung unseres Körpers.

Die Haut kann in drei Kompartimente unterteilt werden: Epidermis, Dermis und Subkutis.

Die Epidermis bildet die äußere Schicht der Haut und besteht aus unterschiedlichen Zelltypen: Neben Melanozyten, Merkel-Zellen, Langerhans-Zellen und Lymphozyten sind Keratinozyten der vorwiegende Zelltyp und bilden ein dichtes und stabiles Netzwerk. Der Aufbau der Epidermis setzt sich (von innen nach außen) aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zusammen (Abbildung 1). Jede dieser Schichten ist Teil einer dauerhaft stattfindenden Proliferation der Keratinozyten und Erneuerung der Epidermis. Je nach Beanspruchung und Hautareal unterscheidet sich die Dicke des Stratum corneum. Durch kontinuierliche Abschilferung der äußeren Schicht muss eine dauerhafte Regeneration und Proliferation aus tieferen Schichten der Epidermis gewährleistet sein [122-124].

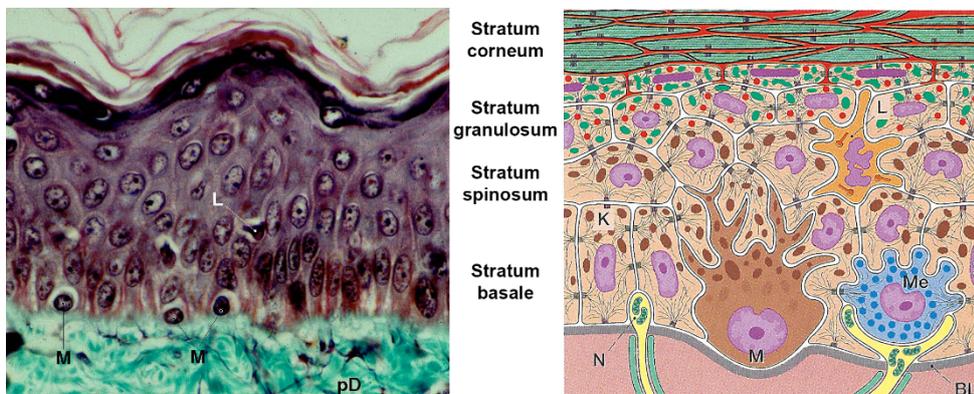


Abbildung 1 Aufbau der Epidermis (modifiziert nach [122])

Abkürzungen: BL = Basallamina; K = Keratinozyt; L = Langerhans-Zelle; M = Melanozyt; Me = Merkelzelle; N = freie Nervenendigung; pD = papilläre Dermis

Zusätzlich gilt die Epidermis als Entstehungsort der sogenannten Hautanhangsgebilde. Diese entwickeln sich aus tiefen Einstülpungen der Epidermis und Zellen der tiefer gelegenen Dermis. Sie gelten als funktionell und morphologisch eigenständig. Dazu gehören beim Menschen Haare, Nägel sowie Talg-, Schweiß- und Brustdrüsen [122, 123].

Das unterhalb der Epidermis gelegene Bindegewebe wird als Dermis bezeichnet. Es erstreckt sich bis zum tiefer gelegenen subkutanen Fettgewebe. Die Dermis besteht zum größten Teil aus Fibroblasten, jedoch sind dort auch Makrophagen und MZ zu finden [122].

Die Dermis wird in zwei Schichten unterteilt: Stratum papillare und Stratum reticulare. Das schmale Stratum papillare bildet die Grenzschicht zur oberhalb liegenden Epidermis und besteht vor allem aus extrazellulärer Matrix, Zellen und Kapillaren, aber auch aus wenigen kollagenen und elastischen Fasern. Das darunter liegende Stratum reticulare besteht aus kollagenen und elastischen Fasern. Diese Schicht ist für die mechanische Eigenschaft der Haut verantwortlich. Dabei sorgen die Kollagenfasern für die mechanische Stabilität und die elastischen Fasern für Festigkeit und Elastizität. Die Synthese der Fasern und der umgebenden Matrix erfolgt durch die Fibroblasten [122].

Die Subcutis bildet die unterste Hautschicht und besteht vorwiegend aus lockerem Bindegewebe. Feine Bindegewebssepten ziehen von der Kutis (Epidermis und Dermis) durch das Fettgewebe hindurch zu Knochen, Knorpeln und Muskelfaszien, um die elastische Haut zu verankern [122, 123].

1.3.2 Gefäße, Nervenfasern und Mastzellen

Die Haut besitzt ein eigenes Gefäßsystem, welches ein gut strukturiertes Netzwerk ist. Es besteht aus zwei zur Oberfläche parallel verlaufenden Gefäßplexi: dem zwischen Epidermis und Dermis liegenden subpapillären Plexus (Plexus subpapillaris) und dem zwischen Dermis und Subcutis gelegenen tiefen dermalen Plexus (Plexus cutaneus). In der Subcutis gelegene Arterien versorgen über Kollateralen den Plexus cutaneus, der dadurch auch in Verbindung mit dem Plexus subpapillaris steht. Von dort ziehen feine Kapillarschlingen in die einzelnen subepidermal gelegenen Papillen und steuern dort die Wärmeregulation des Körpers. Zusätzlich können im Blut zirkulierende Zellen aus diesen Kapillaren austreten und in die Epidermis einwandern [122, 123].

Parallel zu den beiden Gefäßplexi verlaufen in der Haut auch Nervenplexi, ein oberflächlicher und ein tiefer Plexus. Diese werden durch Hautnerven gebildet. Den größten Anteil bilden jedoch freie sensorische Nervenendigungen, die in Epidermis,

Dermis und Subcutis zu finden sind. Sie fungieren als Nozizeptoren, Wärme- und Kälterezeptoren und tragen durch die Abgabe bestimmter Mediatoren auch zur neuroendokrinen-immunen Kommunikation bei. Dabei werden sympathische, cholinerge und peptiderge NF unterschieden [69, 122, 123].

Insbesondere MZ finden sich vorzugsweise in der Nähe von Blutgefäßen und NF [125, 126]. Dies ermöglicht es ihnen in direktem Kontakt mit dem systemischen Kreislauf zu stehen und auf systemische und lokale Signale zu reagieren. Diese Interaktion spielt in der Entstehung und Aufrechterhaltung der neurogenen Entzündung der Haut eine entscheidende Rolle (siehe 1.5.4) [127]. Die Anzahl der mit NF kommunizierenden MZ ist dynamisch und variiert je nach Anforderung [128].

1.3.3 Die allgemeinen Funktionen der Haut

Die wichtigsten Aufgaben der Haut bestehen im Schutz vor äußeren Einflüssen, der Aufnahme von Reizen und Sinneswahrnehmungen und der Temperatur- und Wasserregulation. Gleichzeitig ist die Haut in die Steuerung des Körperstoffwechsels involviert und erfüllt als Teil des Immunsystems wichtige Aufgaben im Rahmen der körpereigenen Abwehr (siehe 1.3.4.)

Die Aufrechterhaltung der Hautbarriere als körpereigene Schutzfunktion wird durch ihren Aufbau ermöglicht: Die oberen Schichten der Epidermis bilden aufgrund ihrer Schuppenbildung, den dichten Zell-Zell-Kontakten und dem hohen Fettgehalt eine undurchdringbare Barriere, die das Eindringen von Keimen verhindert [129]. Gleichzeitig wird durch aktive Abgabe von antimikrobiellen Peptiden (AMP), wie Defensinen und Cathelicidinen, und einem sauren pH-Wert ein protektiver Schutzmantel aufrechterhalten [130-132]. Auch die natürliche bakterielle Hautflora wirkt protektiv. Zusätzlich verhindert die Epidermis den Verlust von Wasser.

Auch intensiver mechanischer Stress wird aufgrund ihrer hohen Elastizität und Zugfestigkeit überstanden. Sollte es dennoch zu Verletzungen der Integrität der Haut kommen, so gewährleistet die dauerhafte Proliferation einen raschen Wiederaufbau der Barriere.

Umwelteindrücke werden durch einen feinen Tastsinn und Temperaturempfinden wahrgenommen, an das Gehirn weitergeleitet und geben dem Menschen so Informationen über die Umwelt.

Durch ihre große Oberfläche und starke Durchblutung trägt die Haut maßgeblich zur Thermoregulation des Körpers bei. Einerseits kann die Temperatur durch die

Regulierung der Durchblutung gesteuert werden, andererseits ermöglicht die Schweißsekretion und dessen Verdunstung eine Kühlung.

1.3.4 Die Haut als aktives Organ des Immunsystems

Die mechanische Hautbarriere dient als erstes Schutzsystem gegen mikrobielle Pathogene, sowie physikalische und chemische Stressoren. Das hauteigene Immunsystem hat sich dabei zu einer zusätzlichen Hürde entwickelt und bildet somit die zweite Barriere. Die Aufrechterhaltung der Immunkompetenz und Gesundheit eines derart großen und exponierten Organs resultiert in besonderen Anforderungen an alle beteiligten Zellen des Immunsystems. Kommt es zu einer inadäquaten Immunantwort, kann eine zu starke, unkontrollierbare Entzündung oder die Entstehung von Tumoren die Folge sein. Eine zu starke und lange Reaktion des Immunsystems kann in chronischen Entzündungen oder Autoimmunerkrankungen resultieren. Die Koordination dieses komplexen Systems stellt die Haut vor eine besondere Aufgabe, da sowohl die Stärke, aber auch Dauer einer Immunreaktion angemessen an die jeweilige Situation sein müssen, sodass mögliche Pathogene eliminiert werden. Zugleich muss die Integrität der Haut gewahrt werden [133].

Kommt es zu einer Entzündung, wird das Immunsystem der Haut aktiviert, welches aus zwei Untergruppen besteht: Dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Beide Systeme unterscheiden sich durch ihre Reaktionsgeschwindigkeit, ihren zugehörigen Zellen und in der Spezifität ihrer Immunantwort. Die Zusammenarbeit dieser beiden Systeme ist notwendig, um eine breit aufgestellte Immunabwehr zu gewährleisten.

Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile, MZ), Makrophagen, dendritische Zellen (DZ), Langerhans-Zellen (LHZ) und natürliche Killerzellen (NKZ) werden zum angeborenen Immunsystem gezählt. Auch Keratinozyten, Endothelzellen und Adipozyten tragen zur angeborenen Immunantwort bei [134]. Zum spezifisch agierenden, erworbenen Immunsystem werden B-Zellen und T-Zellen gezählt. T-Zellen unterscheiden sich in ihren Aufgaben und werden anhand ihrer Oberflächenmerkmale, genannt *cluster of differentiation* (CD), in zwei Gruppen eingeteilt: CD8-positive (CD8+) oder CD4-positive (CD4+) T-Zellen. CD8+ werden cytotoxische T-Zellen, CD4+ hingegen T-Helferzellen (TH) genannt.

MZ, Makrophagen, LHZ, DZ und T-Zellen wandern in die Haut ein und spezialisieren sich erst dort endgültig [135, 136]. Zusätzlich ist das Immunsystem der Haut dazu im Stande, im Blut zirkulierende Immunzellen bei Bedarf zu rekrutieren, um so die Eindämmung einer Infektion oder den Heilungsprozess zu unterstützen [133].

Einleitung

Kennzeichen des angeborenen Immunsystems ist seine hohe, aber unspezifische Erkennungsrate von unterschiedlichen Pathogenen. Diese erfolgt durch die Erkennung von pathogen-assoziierten molekulare Mustern, u.a. Lipopolysacchariden, auf Pathogenen und passenden *pattern-recognition receptors* (PRRs), u.a. Toll-like Rezeptoren, auf der Oberfläche von Immunzellen und Keratinozyten [137, 138].

Keratinozyten sind strategisch günstig in der Haut positioniert und dienen dem Immunsystem als Sensoren in der ersten Reihe. Registrieren sie an ihrer Oberfläche pathogen-assoziierte molekulare Muster kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade und Produktion von AMP, Zytokinen und Chemokinen. AMP töten eindringende Pathogene direkt, locken Immunzellen an und stimulieren zusätzlich die Zytokinproduktion. Hinzu kommt, dass die Produktion der AMP durch T-Zellen gesteigert wird [139]. Neben den AMP sind Keratinozyten in der Lage, Zytokine, vor allem Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-10, *transforming growth factor β* (TGF- β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α), zu sezernieren [134, 140-143]. Diese fördern die Aktivierung von TH und DZ, aber auch die Reifung von B-Zellen. Zusätzlich locken Keratinozyten durch die Sekretion verschiedener Chemokine T-Zellen, Neutrophile und LHZ an [144]. Durch diese Vielzahl an Mechanismen konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten sogar der Beginn einer entzündlichen Reaktion sein können [145].

Sollte ein Pathogen diese erste Immunbarriere überwinden, befinden sich in der Dermis weitere Zellen des angeborenen Immunsystems. Die wichtigste Gruppe bilden dabei die *antigen-presenting cells* (APCs), zu denen die epidermalen LHZ, die dermalen DZ und Makrophagen gehören. Die Aufgabe der APCs liegt einerseits in der Phagozytose und Präsentation von Antigenen und der Einleitung einer Immunantwort durch das erworbene Immunsystem, andererseits in der Sekretion von Zytokinen, um die Immunreaktion zu steuern. Jeder Zelltyp hat dabei bestimmte Funktionen und trägt zur Immunabwehr bei: Neutrophile sind unmittelbar bei der Abwehr von Pathogenen beteiligt, Basophile und Eosinophile spielen vor allem bei antiparasitären oder allergischen Reaktionen eine wichtige Rolle [146, 147]. MZ sind typische in der Haut beheimatete Zellen, die in die Abwehr von parasitären Infektionen, aber auch in akute allergische Reaktionen und chronischen Hauterkrankungen, wie der AD, involviert sind [30] (siehe 1.5). NKZ erkennen über Zelloberflächenrezeptoren den *major histocompatibility complex* und leiten deren Apoptose ein, wenn das Expressionsmuster vom körpereigenen Muster abweicht. Zusätzlich können NKZ auch an bereits Antikörper (AK)-markierte Zellen binden und diese mittels Perforin und Granzymen abtöten [148].

Einleitung

Das gleichzeitig durch Zytokine und Antigenpräsentation aktivierte erworbene Immunsystem agiert spezifisch und ermöglicht dadurch eine kontrollierte und effektive Immunreaktion. Diese erfolgt deutlich verzögert, was die schnelle, aber unkontrollierte Immunreaktion des angeborenen Immunsystems umso wichtiger macht.

Der Ablauf dieser spezifischen Abwehrmaßnahmen wird über T-Zellen und B-Zellen bewerkstelligt. Den größten Anteil der Zellen des adaptiven Immunsystems bilden die T-Zellen. Ihre Konzentration übersteigt in der Haut die der im Blut zirkulierenden T-Zellen um das Doppelte [149]. CD8+-Zellen gelten als Effektorzellen, die spezifische Antigene erkennen und die Antigen-tragenden Zellen töten. CD4+-Zellen werden durch APC aktiviert und helfen CD8+-Zellen, B-Zellen und DZ bei der Produktion spezifischer AK. Sie unterstützen deren Reifung zu kompetenten Immunzellen. Damit helfen sie den Effektorzellen bei der Fokussierung, unterstützen die Einwanderung weiterer Immunzellen und koordinieren die Ausrichtung der Immunantwort, je nach Art des Pathogens. Sie selbst sind nicht zytotoxisch. Die TH werden traditionell, abhängig von ihrer jeweiligen Zytokinsekretion, in verschiedene Untergruppen unterteilt. TH des Typ 1 (TH1) interagieren im Gewebe mit Makrophagen und CD8+-Zellen, produzieren Interferon-gamma (IFN- γ) und induzieren die Sekretion TH1-spezifischer Zytokine, wie TNF α und IL-1 β [150]. Gleichzeitig werden TH2 durch IFN- γ supprimiert. Insgesamt sind TH1 als pro-inflammatorische Zellen zu betrachten, die vor allem bei viralen und bakteriellen Pathogenen im Vordergrund stehen. Überwiegt einer der beiden Zelltypen, spricht man von einer TH1- oder TH2-Immunität/Immunantwort. Dysregulationen der TH1-Immunantwort stehen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und immun-gesteuerten Pathologien, wie der chronischen Hauterkrankung Psoriasis [151]. TH2-Immunantworten zeichnen sich durch IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und TGF- β als vorherrschende Zytokine aus und rekrutieren mit diesen MZ, Basophile und Eosinophile [150]. Außerdem leiten sie die Umwandlung einer B-Zelle in eine AK-sezernierende Plasmazelle mittels TNFR5/CD40-Aktivierung und IL-4 ein [152]. Die TH2-Immunantwort ist vorwiegend antiparasitär, trägt aber auch zur Entwicklung allergischer Erkrankungen, wie der AD, bei. IL-10 und TGF- β unterdrücken gleichzeitig TH1-Zytokine und wirken somit proallergisch [153].

Zusätzlich zu diesen beiden bekannten TH-Untergruppen wurden auch TH17 entdeckt, die vor allem IL-17, IL-21 und IL-22 produzieren. Für sie konnte gezeigt werden, dass Fehlregulationen im Zusammenhang mit der Entstehung der AD stehen [154]. Auch nur IL-22 produzierende TH, sog. TH22, wurden identifiziert und konnten in Hautkulturen von AD Patienten nachgewiesen werden [155]. Sie scheinen entscheidend am

Übergang in die chronische AD involviert zu sein [156]. Des Weiteren scheinen auch regulatorische T-Zellen in der AD von entscheidender Bedeutung zu sein [157].

Je nach Auslöser kommt es zu einer spezifischen Aktivierung des Immunsystems, die, wie im Falle von TH1 und TH2, den jeweiligen Gegenspieler durch spezifische Zytokine supprimiert. Durch die Dominanz eines dieser Systeme wird ein spezifisches Zytokinprofil erzeugt. Die AD, eine durch eine TH2-Dominanz getriggerte Erkrankung, zeigt ein solches Profil.

In dieser Arbeit wird der Fokus auf dem Konzept der TH1/TH2-Immunität liegen, da sich dieses für das Verständnis der immunologischen Mechanismen und die Pathogenese der AD bewährt hat.

1.3.5 Neuroendokrine-immune Interaktion

Zusätzlich zu der bereits innerhalb des Immunsystems sehr komplexen Steuerung und Koordination der unterschiedlichen Zelltypen in immer wechselnden Bedingungen nimmt auch das neuroendokrine System Einfluss auf das Immunsystem der Haut. Ermöglicht wird dies einerseits durch den Blutkreislauf, andererseits durch eine dichte Innervation und direkte neuronale Abgabe der jeweiligen Mediatoren. Zusätzlich können aber auch Immunzellen, u.a. MZ und Lymphozyten Quellen dieser Mediatoren sein und im Gegenzug Einfluss auf das periphere oder zentrale Nervensystem nehmen.

Akuter Stress fördert die Freisetzung von Adrenalin/Noradrenalin und Cortisol innerhalb weniger Min. und das Immunsystem reagiert mit einer zellulären TH1-Antwort. Chronischer Stress hingegen löst eine TH2-Immunreaktion aus, steigert die basale Cortisol-Sekretion und ist im Stande die gewebebeschädigende, zelluläre Immunantwort zu terminieren, fördert aber gleichzeitig die Entwicklung und den Unterhalt atopischer Erkrankungen, wie der AD. Im Detail ist dieser Effekt auf die SA und HHNA zurückzuführen. Katecholamine und Cortisol hemmen die Synthese der TH1-spezifischen Zytokine IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF α , fördern die Synthese der TH2-Mediatoren IL-4 und IL-10 und induzieren so einen Shift in Richtung humoraler TH2-Immunität [158].

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Zellen des Immunsystems auch Rezeptoren für SP, NGF, BDNF und ACh auf ihrer Oberfläche exprimieren, gleichzeitig aber auch eigenständig diese Stressmediatoren produzieren können [159, 160].

In der Haut wird SP von NF, Hautzellen und Immunzellen produziert und sezerniert [161]. Für SP zeigte sich, dass es modulierend auf die Zellproliferation, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation wirkt und zusätzlich MZ degranulieren lässt [162]. MZ sezernieren

Einleitung

daraufhin Proteasen, Histamin, Zytokine, u.a. TNF α , IL-1 β , aber auch NT, wie NGF. NGF fördert das Wachstum sensorischer, peptiderger NF und steigert, wie Histamin und MZP, deren SP-Synthese. Neben MZ wird NGF auch durch Lymphozyten, Makrophagen und Keratinozyten gebildet und dient zur interzellulären Kommunikation [163]. Der hier beschriebene, enge räumliche und immunologische Zusammenhang zwischen MZ, NF, SP und NGF spielt vor allem im Rahmen der Verschlechterung der AD und der neurogenen Entzündung eine Rolle (siehe 1.5.4) [13, 57, 164].

Wichtige Einblicke in das NNCS der Haut und dessen Beteiligung an entzündlichen Erkrankungen im Falle einer Dysregulation konnten vor allem durch Grando et al. und Kindt et al. erlangt werden [165-169]. Grando et al. gelten bis heute als Wegbereiter der Erforschung des kutanen NNCS. ACh kann von cholinergen NF, Immunzellen oder ansässigen Zellen, z.B. Keratinozyten, produziert werden [23, 166, 170, 171]. Nach der Sekretion kann dieses autokrin oder parakrin wirken. Gleichzeitig exprimieren u.a. Lymphozyten, Makrophagen und MZ nAChR und mAChR auf ihrer Oberfläche [172, 173]. Der nAChR α 7 unterdrückt die Produktion der TH1-Mediatoren IFN- γ , TNF α und IL-1 β fördert somit TH2 und greift immunmodulatorisch ein [174].

Die Rolle des CS/NNCS in Bezug auf das Immunsystem ist bis heute weitestgehend unklar. Untersuchungen zeigten jedoch, dass es auch in die Pathogenese der AD und deren Veränderung unter Stress involviert ist [8].

1.4 Atopische Dermatitis

Die AD (syn.: Neurodermitis; atopisches Ekzem) ist eine nicht ansteckende, entzündliche, stark juckende und chronisch oder chronisch-rezidivierend auftretende Hauterkrankung, die oftmals bereits im Kindesalter beginnt [175]. Zusammen mit der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale gehört sie dem Formenkreis der atopischen Erkrankungen an [175]. Für die AD werden genetische, immunologische und psychische Faktoren als mögliche Ursachen diskutiert. Die Prävalenz wird auf 10-30% in der Allgemeinbevölkerung mit steigender Inzidenz, speziell in Industrieländern, geschätzt [176-180].

1.4.1 Klinik

Das führende Symptom der AD ist der Juckreiz. Das klinische Erscheinungsbild der AD kann sich je nach Patient unterscheiden und lässt sich schwer von anderen Hauterscheinungen abgrenzen. Ein spezifischer AD-Marker fehlt, weshalb die AD vor allem eine klinische Diagnose ist. Basis der Diagnostik bilden die von Hanifin und Rajka erhobenen Haupt- und Nebenkriterien, die später durch die *American Academy of Dermatology* überarbeitet wurden (Tabelle 1) [181].

Tabelle 1 Diagnosekriterien der Atopischen Dermatitis

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Pruritus (v.a. nachts) typische Morphe <ul style="list-style-type: none"> • Ekzem • Lichenifikation • Papeln typische Lokalisation <ul style="list-style-type: none"> • Kinder: Gesicht und Streckeseiten der Extremitäten • Jugendliche: Beugeseiten der Extremitäten Verlauf <ul style="list-style-type: none"> • chronisch undulierend • rezidivierend Atopie (persönlich oder familiär) <ul style="list-style-type: none"> • allergisches Asthma bronchiale • allergische Rhinokonjunktivitis • atopische Dermatitis 	Trigger <ul style="list-style-type: none"> • kutane Irritationen • Nahrungsmittel • Umweltfaktoren • psychischer Stress Besonderheiten des atopischen Gesichtes <ul style="list-style-type: none"> • Gesichtsblässe • Gesichts-, Perioral-, Lidexzem • Konjunktivitis, halonierte Augen, doppelte Lidfalte • Cheilitis • periorale Fältchen Zusätzlich <ul style="list-style-type: none"> • früher Beginn • trockene Haut • Hyperlinerität der Handflächen • weißer Dermographismus Immunologische Auffälligkeiten <ul style="list-style-type: none"> • erhöhtes IgE Komplikationen <ul style="list-style-type: none"> • bakterielle und virale Hautinfektionen

1.4.2 Pathogenese und Immunologie

Bezüglich der Pathogenese gelten bisher zwei unterschiedliche immunologische Hypothesen:

Die derzeit führende Hypothese besagt, dass zunächst ein primärer Defekt der Hautbarriere vorliegt, der das Eindringen von Allergenen oder Pathogenen ermöglicht und somit eine immunologische Reaktion, wie im Verlauf beschrieben, auslöst („outside-to-inside-Hypothese“) [182].

Ursprünglich ging man von einer immunologischen Dysregulation als primäre Ursache aus („inside-to-outside-Hypothese“) [183]. Das im Fokus stehende immunologische Ungleichgewicht wird vor allem über T-Zellen, speziell die TH, definiert [184]. In akuten Stadien der AD dominieren TH2. Dies resultiert in einer erhöhten Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese steigern die Produktion von Immunglobulin E (IgE) durch B-Zellen, fördern die Mastzelldegranulation und die Eosinophilie. Bei einem chronischen Verlauf (>48 Std.) überwiegt hingegen die TH1-Immunität [185]. Die Folge dieser immunologischen Dysregulation ist eine dermale Entzündung und Beschädigung der Hautbarriere, welche das Eindringen von Pathogenen ermöglicht und die Entzündung unterhält.

1.4.3 Zusammenhang der Atopischen Dermatitis mit psychischer Belastung und Stress

Seit geraumer Zeit wird angenommen, dass Stress atopische Erkrankungen, wie die AD, verstärkt oder sogar auslösen kann [19, 128]. Einigen Studien zeigen, dass bereits pränataler oder frühkindlicher Stress das Risiko für allergische Erkrankungen steigert [186, 187]. Zahlreichere Untersuchungen fokussierten sich jedoch auf die direkte Interaktion des Stressempfindens mit der Ausprägung der AD [164]. Der genaue Mechanismus ist unklar, der Zusammenhang zwischen AD und Stress wird aber dennoch vielfach postuliert und ist vor allem auf Beobachtungen an AD-Patienten zurückzuführen [188, 189].

Humane Studien haben gezeigt, dass Persönlichkeitsmerkmale oder psychische Eigenschaften, wie die Stress- oder Angstwahrnehmung, mit der Ausprägung der AD positiv korrelieren [190-192]. Typische, spezifische Eigenschaften für eine AD-Persönlichkeit konnten hingegen nicht zugeordnet werden, da auch Patienten mit anderen chronischen Erkrankungen diese aufweisen.

Ein großer Teil der heute bekannten Mechanismen ist auf Untersuchungen in unterschiedlichen Tiermodellen, vorwiegend an Mäusen, zurückzuführen. Die

durchgeführten Untersuchungen fokussierten sich dabei auf die SA und HHNA [16, 19]. Insbesondere der von ihnen ausgelöste Shift in Richtung einer TH2-Immunität steht im Fokus der immunologischen Dysregulation [193].

Inzwischen ist bekannt, dass neben der SA und HHNA vor allem SP und NGF, die Schlüsselspieler der neurogenen Entzündung, von entscheidender Bedeutung sind [127, 194]. Entscheidend hierfür ist die dichte Innervation der Haut und die neuroendokrine-immune Kommunikation, insbesondere mit MZ, die eine lokale Reaktion auf systemische Stressoren erlaubt und in der Literatur auch als Gehirn-Haut-Achse bezeichnet wird (siehe 1.5.4) [9, 195, 196].

Im Fokus der Pathogenese steht eine Störung der Hautbarriere mit entweder vorangegangener oder folgender Dysregulation des kutanen Immunsystems. Insbesondere an diesen Stellen lassen sich Verbindungen zwischen der AD und dem CS der Haut herstellen. In der Haut von AD-Patienten konnte eine erhöhte Konzentration von ACh nachgewiesen werden [197]. Neben ACh bindet auch der endogene Ligand SLURP1 an ACh-Rezeptoren (AChR) und trägt zur Regulation und Proliferation der Keratinozyten und Immunzellen bei [166]. In SLURP1-defizienten Tieren konnte gezeigt werden, dass SLURP1-Mangel zu einer Störung der Keratinozyten-Differenzierung führt [112]. In der Haut kommt es zu einer reduzierten Expression cholinergischer Rezeptoren, u.a. nAChR α 7 und deren Liganden [8, 168]. Zusätzlich reagiert die Haut von AD-Patienten auf die Injektion von ACh mit Juckreiz, einem Leitsymptom der AD, die Haut gesunder Probanden hingegen nicht [198, 199]. Peters et al. zeigten, dass psychologischer Stress beim Menschen zu einer reduzierten Expression von SLURP1 führen kann, aber insbesondere die Kombination aus AD und Stress das CS der Haut stört und zu einer Verschlechterung der AD beiträgt [8]. Curtis und Kollegen zeigten, dass Stress die Hautbarriere beeinträchtigt, dieser Effekt aber durch topische Gabe cholinergischer A- und Antagonisten beeinflusst werden kann [200].

Möglicherweise spielt auch die durch nAChR α 7 beeinflusste Expression TH1-spezifischer Zytokine in Makrophagen oder MZ eine Rolle in der Stärke und Aufrechterhaltung der AD [110].

1.5 Mastzellen im Zentrum von Entzündung und Stress

1.5.1 Entdeckung, Herkunft und Differenzierung

Die Entdeckung der MZ ist auf Paul Ehrlich im Jahre 1877 zurückzuführen. Ihren Namen verdanken sie Ehrlichs Annahme, dass MZ zur „Fütterung“ umliegender Zellen existieren und diese „mästen“ [201].

MZ entstehen im Knochenmark oder anderen blutbildenden Geweben aus Vorläuferzellen und wandern von dort in Richtung ihres Zielgewebes [202, 203]. Die endgültige Reifung erfolgt unter dem Einfluss der lokalen, gewebespezifischen Konditionen des Zielgewebes. Diese werden durch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, u.a. IL, SP, *stem cell factor* (SCF) und NGF gebildet und können sich auch innerhalb eines Gewebes unterscheiden [204, 205]. Das von anderen Immunzellen, u.a. MZ, und freien Nervenenden abgegebene SCF und NGF ist zusätzlich für die Rekrutierung der MZ verantwortlich. Aufgrund ihrer Heterogenität sind MZ in der Lage, eine adäquate Antwort auf physiologische, immunologische und andere Signale zu ermöglichen, falls es zu Änderungen innerhalb ihres Mikromilieus kommt.

Neben ihrer Lokalisierung unterscheiden sich MZ in ihrer Morphologie und Zusammensetzung ihrer Mediatoren [205].

1.5.2 Rezeptoren, Aktivierung und Mediatoren

Je nach Milieu exprimieren MZ eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren und passen die Produktion und Abgabe spezifischer MZ-Mediatoren an [205]. Zu den bekanntesten Rezeptoren gehört der hochaffine IgE-bindende Rezeptor (FcεRI) [206]. IgE wird im Rahmen allergischer Reaktionen durch B-Zellen gebildet, bindet an der Oberfläche der MZ an FcεRI und ist für die Erkennung und Bindung von Antigenen, u.a. Allergenen, von großer Bedeutung. Die Bindung von Antigenen an IgE und die folgende Quervernetzung der FcεRI löst eine sofortige Degranulation der MZ und Freisetzung verschiedener Mediatoren, u.a. Histamin, aus [207, 208].

Neben dieser AK-abhängigen Aktivierung der MZ erlaubt ein großes Repertoire an Rezeptoren für Stressmediatoren, wie adrenerge Rezeptoren, CRH-Rezeptoren, NKR, NTR und AChR, auch eine Aktivierung der MZ, durch Hormone, Neurotransmitter, Zytokine, NP und NT [25, 209]. Auch hier kann eine Degranulation, aber auch die spezifische Abgabe von MZ-Mediatoren, wie z.B. Zytokinen, erfolgen [210].

Die günstige Positionierung der MZ in der Haut ermöglicht es ihnen, durch Stressmediatoren, die die Haut über den Blutkreislauf oder NF erreichen, aktiviert zu

Einleitung

werden. Zusätzlich können diese Mediatoren auch lokal produziert und sezerniert werden [211, 212]. Folglich werden MZ durch systemische und neuronale Abgabe von CRH, SP, NGF, BDNF und ACh, durch sensorische, peptiderge und cholinerge NF, aktiviert [213, 214].

Unter Berücksichtigung ihrer ausgeprägten und vielfältigen Expression von Stressmediator-spezifischen Rezeptoren können MZ als Sensoren für wahrgenommenen Stress verstanden werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass mentaler oder emotionaler Stress die Aktivierung und Degranulation von MZ auslösen können [20]. Die Ursache liegt in der Aktivierung der unterschiedlichen Stresssysteme.

Einmal aktiviert, geben MZ unterschiedliche Mediatoren ab, zu denen biogene Amine, wie Histamin, Chemokine, MZP, Peptide, wie SP, ACh, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Phospholipidmetabolite gehören [25, 208]. Diese werden in zwei Gruppen eingeteilt: Vorgespeicherte und *de-novo* synthetisierte Mediatoren (Abbildung 2).

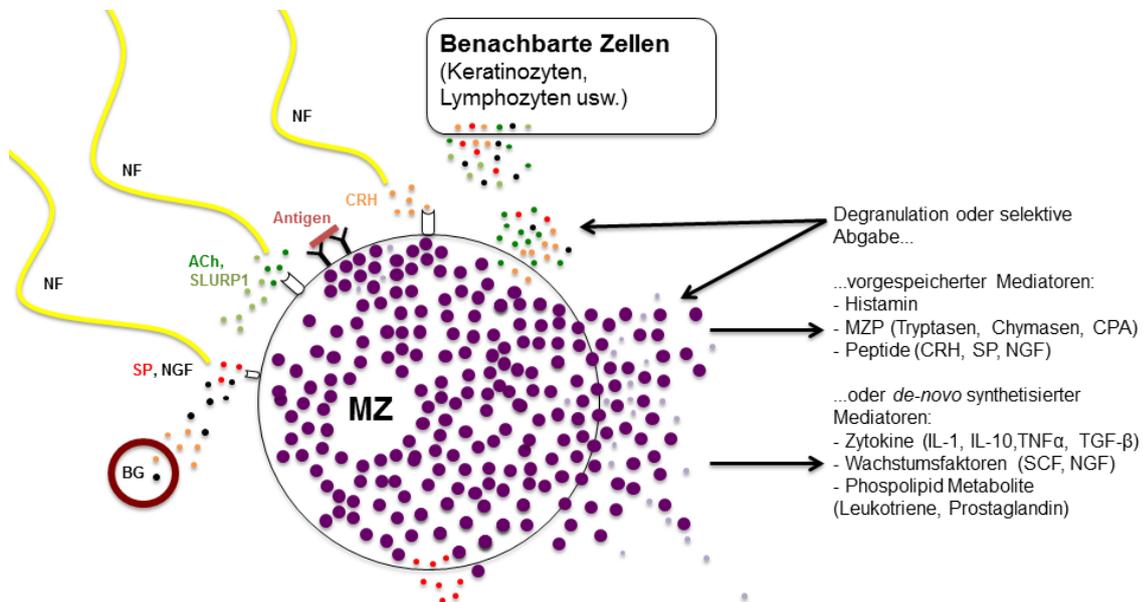


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Mastzellaktivierung und sezernierter Mediatoren

Mastzellen können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mediatoren aktiviert werden. Die Herkunft dieser ist dabei vielfältig und reicht von Nervenfasern über den Blutkreislauf bis hin zu anderen Zellen. Je nach Aktivierung können Mastzellen degranulieren oder selektiv bestimmte Mediatoren sezernieren. Der Einfachheit halber sind nur die für diese Arbeit wichtigen Rezeptoren dargestellt; es existieren noch weitere neuro-immune Kontakte z.B. noradrenerge Nervenfasern. Abkürzungen: BG = Blutgefäß

Einleitung

Den größten Anteil der in Mastzellgranula gelagerten Proteine bilden MZP [215]. Unter dem Begriff der MZP wird eine Gruppe von Enzymen (Chymasen, Tryptasen, Carboxypeptidase A (CPA)) zusammengefasst, die vorwiegend durch MZ exprimiert werden. Die Expression der MZP variiert je nach MZ-Typ und Spezies [216, 217]. Humane MZ werden nach ihrer vorwiegenden Protease eingeteilt (MZ_T: Tryptasen, MZ_{TC}: Chymasen, Tryptasen und CPA), murine MZ hingegen nach ihrer Lokalisation: *mucosa mast cells* (MMCs) und *connective tissue mast cells* (CTMCs). MMCs finden sich in Schleimhäuten, CTMCs hingegen in Bindegeweben. Dabei unterscheiden sich MMCs und CTMCs durch ihre spezifische Expression unterschiedlicher Chymasen, Tryptasen und CPA (Tabelle 2). Die größte Homologie besitzt dabei die murine Protease MZP4 mit der humanen Chymase 1 und MZP6 mit der β -Tryptase [218, 219]. Insbesondere die Entwicklung spezifischer MZP-defizienter Mausstämmen hat in den vergangenen Jahren Einblicke in die Rolle der MZP innerhalb des Immunsystems ermöglicht [220-223].

Tabelle 2 Einteilung humaner und muriner Mastzellproteasen (nach [26])

Spezies	MZ-Typ	Chymase	Tryptase	Carboxypeptidase
Human	MZ _T		α , β	
	MZ _{TC}	Chymase 1	α , β	CPA
Murin	MMC	MZP1 MZP2		CPA
	CTMC	MZP4 MZP5 MZP9	MZP6 MZP7	CPA

1.5.3 Die Mastzelle als Schlüsselspieler der Immunantwort

Seit ihrer Entdeckung stehen MZ vor allem für ihre Rolle in allergischen und anaphylaktischen Reaktionen im Fokus der Wissenschaft [224-227]. Erst die letzten Jahre zeigten, dass sie in komplexe Immunreaktionen involviert sind. Neben ihrer Beteiligung an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind sie ein entscheidender Bestandteil des angeborenen und erworbenen Immunsystems [31, 228-231]. Erste Hinweise dafür liefert bereits die Tatsache, dass MZ in allen Organen, besonders häufig jedoch in grenzbildenden Organen wie der Haut, anzutreffen sind [232].

Kommt es durch bakterielle oder virale Produkte, Parasiten, Gifte oder Peptide, z.B. Teile des Komplementsystems, zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems,

werden auch MZ aktiviert. Entscheidend an der Erkennung dieser Signale sind u.a. die an der Oberfläche der MZ exprimierten PRRs beteiligt. Mit der Erkennung fremder Signale kommt es zur Abgabe spezifischer MZ-Mediatoren [233].

Das von MZ abgegebene Histamin sorgt für eine Vasodilatation, erhöht die Gefäßpermeabilität, induziert Juckreiz über sensorische NF und nimmt Einfluss auf die Produktion TH1- oder TH2-spezifischer Zytokine. Zusätzlich stimuliert Histamin die Abgabe von SP durch NF und SP wirkt aktivierend auf MZ [162]. Dieser Zusammenhang spielt vor allem in der neurogenen Entzündung eine entscheidende Rolle (siehe 1.5.4). Durch Chemokine locken MZ weitere Zellen des Immunsystems an. Auch das TH1-Zytokin TNF α , Leukotriene und MZP6 tragen zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei [234-236]. Zusätzlich konnte in vitro gezeigt werden, dass MZ Bakterien phagozytieren können und an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Durch die Abgabe von AMP können sie bakterizid wirken [237, 238].

MZ haben die Möglichkeit, die Entwicklung, Stärke und den Ablauf einer Immunantwort durch das erworbene Immunsystem zu beeinflussen [239]. Die von aktivierten MZ abgegebenen Mediatoren können, neben ihrer Rolle in der angeborenen Immunabwehr, der Interaktion mit T-, B- und dendritischen Zellen des erworbenen Immunsystems, dienen. Hieraus ergibt sich die Frage, inwieweit MZ in der Lage sind, eine Immunantwort zu unterdrücken, zu limitieren oder zu beenden. Hierzu zeigten unterschiedliche Studien, dass MZ auch anti-inflammatorische Funktionen übernehmen können [240]. Dabei stehen vor allem die TH2-spezifischen Mediatoren IL-4, IL-10 und TGF- β im Vordergrund, aber auch MZP [153, 220, 241, 242].

1.5.4 Die Rolle der Mastzellen in der Atopischen Dermatitis

In der Haut von AD-Patienten wird eine erhöhte Anzahl und eine vermehrte Degranulation von MZ beobachtet [243, 244]. Die Degranulation korreliert positiv mit der Schwere der AD [245]. Auch MZ-Mediatoren, wie Histamin und die TH2-spezifischen Zytokine sind in der Haut Betroffener vermehrt nachweisbar [246-248]. Insbesondere MZ sind eine wichtige Quelle für IL-4, welches zur Entstehung der AD beiträgt [249]. Auch die von MZ sezernierten MZP sind erhöht und in die Induktion des AD-typischen Juckreizes und die klinische Erscheinung der AD involviert [250-253].

Eine wichtige Rolle kommt den MZ in der Verschlechterung der AD im Rahmen der neurogenen Entzündung zu [57]. Der Begriff der neurogenen Entzündung beschreibt eine lokale Entzündungsreaktion, die mit einer Vasodilatation, gesteigerter Gefäßpermeabilität, Schmerz und Juckreiz einhergeht. Entscheidend hierbei ist die Interaktion von MZ und NF [127]. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass in

der Haut die Anzahl SP-positiver NF sowohl unter Stress, als auch bei AD zunimmt [13]. Auch NGF liegt in erhöhten Konzentrationen vor und ist maßgeblich am Wachstum der NF in der Haut beteiligt. Weiterhin fördert es die zusätzliche Abgabe von SP durch NF [254]. Abgegebenes CRH und SP trägt zur Aktivierung der MZ bei [255]. Gleichzeitig fördern die von MZ sezernierten Mediatoren, u.a. Histamin, NGF, SP und Proteasen, die zunehmende Abgabe von SP durch NF. Es kommt zur Verstärkung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion [13]. Die Vasodilatation ist auf das von MZ sezernierte Histamin und das von NF stammende *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) zurückzuführen. Die erhöhte Permeabilität wird durch SP kontrolliert, gleichzeitig werden Adhäsionsmoleküle an den Gefäßen hochreguliert, welche die Einwanderung von Immunzellen fördern. Zusätzlich fördern diesen Prozess die von MZ stammenden Zytokine [25] (Abbildung 3).

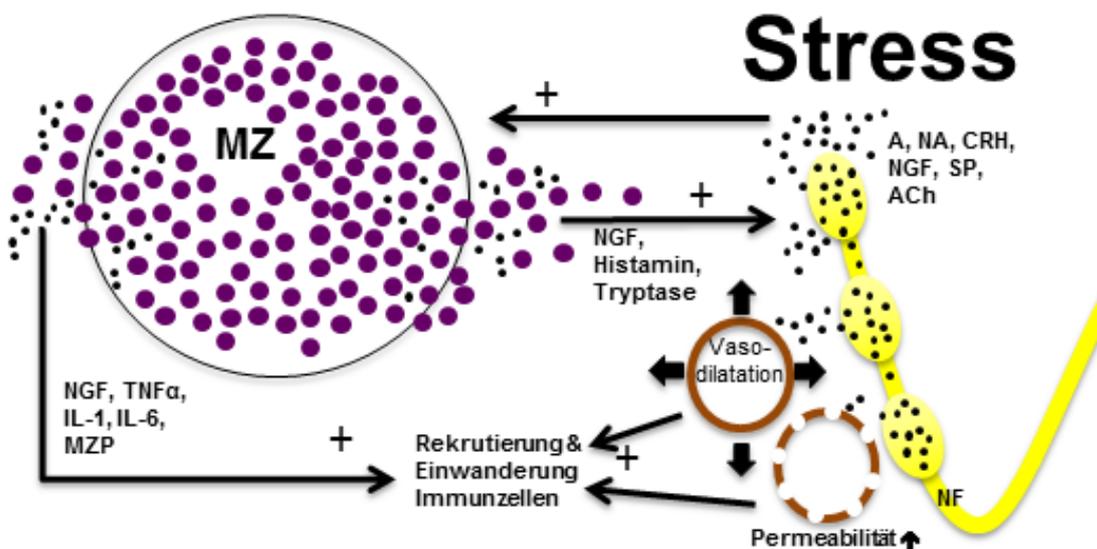


Abbildung 3 Rolle der Mastzellen in der neurogenen Entzündung

Im Rahmen einer systemischen Stressantwort werden Mastzellen durch u.a. von Nervenfasern stammenden Stressmediatoren aktiviert. Dabei werden die Nervenfasern je nach Mediator unterschieden und u.a. als cholinerg, adrenerg oder peptiderg bezeichnet (siehe Abbildung 2), in dieser Abbildung jedoch exemplarisch zusammengefasst. In Folge der Mastzell-Aktivierung kommt es unter anderem zu einer Sekretion von NGF und verschiedener Zytokine. NGF stimuliert die Abgabe von SP und NGF durch sensorische Nervenfasern. Beide Mediatoren aktivieren die Mastzelle und fördern eine weitere SP Sekretion. Gleichzeitig erhöht SP die Permeabilität der Gefäße und CGRP leitet eine Vasodilatation ein. Die Einwanderung von Immunzellen und Entzündungsmediatoren wird verstärkt, die Mastzell-Nervenfasern-Interaktion aufrechtzuerhalten. Es kommt zu einer neurogenen Entzündung der Haut. Abkürzungen: A = Adrenalin; NA = Noradrenalin

Einleitung

Den MZP kommt im Rahmen der AD eine besondere Rolle zu. Bisher wurde angenommen, dass vor allem das von MZ sezernierte Histamin für den Juckreiz in der AD verantwortlich ist. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die MZP von entscheidender Bedeutung sind [256]. MZP6 bindet an *proteinase-activated receptors* (PARs) auf sensorischen NF und induziert die Abgabe von SP [257, 258]. Gleichzeitig baut sie CGRP, die MZP4 hingegen SP und TNF α ab [27, 223, 259]. NGF hat zudem einen verstärkenden Einfluss auf die Funktion der Tryptase [29].

Welche Funktionen MZ im Rahmen des NNCS übernehmen ist bisher unklar, jedoch konnte immunhistologisch eine Expression von ChAT, AChR sowie AChE nachgewiesen werden [197, 260, 261]. Die Tatsache, dass die ACh Konzentration in der Haut von AD-Patienten erhöht ist, dieses MZ aktivieren kann und gleichzeitig in Juckreiz resultiert gibt erste Hinweise auf eine Beteiligung in diesem System [197-199]. MZ könnten somit entscheidende Quellen für ACh sein und damit Entzündung, Juckreiz, Hautbarriere und Zytokinprofil in der AD beeinflussen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Stress auf Entzündungen der Haut am Beispiel der Atopischen Dermatitis zu untersuchen. Der Schwerpunkt wird dabei auf der Regulation des NNCS auf molekularer Ebene und Proteinebene liegen. Die Basis dieser Untersuchungen wird ein bereits etabliertes Tiermodell bilden, das AID-Stress-Modell (siehe 2.2.1) [13, 262]. Dabei wird ein besonderer Fokus auf den kutanen MZ liegen.

Folgende Fragen sollen im Einzelnen behandelt werden:

- Haben Stress und AID einen Einfluss auf NNCS-assoziierte Gene in muriner Vollhaut?
 - Acetylcholin-Stoffwechsel: ChAT, VACht, AChE, BChE
 - Acetylcholin-Rezeptoren: nAChR α 7, mAChR3
 - Endogene Liganden: SLURP1
- Was bewirken Stress und AID in Bezug auf die ACh-Konzentration in muriner Vollhaut?
- Hat Stress einen Einfluss auf die Genexpression NNCS-abhängiger pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und relevanter, assoziierter Rezeptoren in muriner Vollhaut?
- Welche Auswirkungen hat das Blockieren von NGF und BDNF in muriner Vollhaut von gestressten AID-Tieren?
- Exprimieren kutane Mastzellen NNCS-assoziierte Proteine und wie verändert sich deren Expressionsmuster im AID-Stress-Modell?
- Wie verändert sich die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Mastzellproteasen unter Stress und AID Bedingungen?
- Welchen Einfluss hat die Stimulation mit definierten Stressmediatoren auf die Genexpression von kultivierten peritonealen Mastzellen von Wildtyp- und nAChR α 7-defizienten Mäusen?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Tiere

Im Rahmen des AID-Stress-Modells wurden weibliche, 7-8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Diese wurden nach ihrer Ankunft zufällig in sechs verschiedene Gruppen zu je zehn Tieren verteilt (siehe 2.2.1). Die Tierhaltung und experimentelle Durchführung wurden gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung an der Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum, angemeldet und genehmigt (Projektnummer: G0075/03). Während der gesamten Dauer der Experimente wurden die Tiere unter speziellen keimarmen Bedingungen, in einem 12-Std.-Tag-Nacht-Zyklus, bei 22-24 °C Raumtemperatur (RT) und freiem Futter- und Wasserzugang gehalten.

Des Weiteren wurde für die Testung möglicher nAChR α 7- und mAChR3-spezifischer AK Gewebematerial von 7-8 Wochen alten nAChR α 7-Knockout (α 7-KO) und mAChR3-Knockout (m3-KO) Mäusen genutzt [263]. Die Erstellung und Charakterisierung der α 7-KO und m3-KO Mäuse wurde bereits an anderer Stelle im Detail beschrieben [264, 265]. Als entsprechende Hintergrundstämme dienten C57Bl/6J Mäuse für α 7-KO Tiere und B6NTac Mäuse für m3-KO Tiere. Das Gewebematerial der m3-KO und B6NTac Mäuse wurde durch Herrn Prof. Dr. Kummer, Leiter der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt.

Für die Durchführung der peritonealen Mastzellkultur (PMZK) wurden MZ von 26-35 Wochen alten Wildtyp (Wt) und α 7-KO Mäusen entnommen. Der Genotyp jedes KO-Tieres wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft (siehe 2.2.3). Die Tierhaltung und experimentelle Durchführung sind gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung des §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch das hessische Regierungspräsidium Gießen angemeldet und genehmigt worden (Aktenzeichen der Universität Gießen: 496_M).

Zur Überprüfung der Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten ChAT-AK wurde Gewebematerial von genetisch veränderten ChAT-eGFP Mäusen verwendet [266]. Diese Gewebeproben wurden durch Dr. Amir Rafiq, Mitglied der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie von Herrn Prof. Dr. Kummer am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

2.1.2 Instrumente

Im Folgenden werden alle verwendeten Instrumente, Labormaterialien, Chemikalien und Reagenzien, Kits, Medien, Puffer und Lösungen, AK, Blockpeptide, Primer und Software tabellarisch aufgelistet (Tabelle 3 - 13)

Tabelle 3 Liste der verwendeten Instrumente

Gerät	Modell	Hersteller
Abzug	2-453-GAND	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Autoklav	3870 ELV	Systec (Wettenberg, Gießen)
Brutschrank	BB 6060	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Geldokumentationssystem	n.a.	PHASE-HL (Lübeck, Deutschland)
Gelelektrophorese-Kammer + Stromquelle	40-1214 PeqPower E250	PEQLAB (Erlangen, Deutschland) PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Gelkamm	40-1214	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Haartrimmer	Typ 1574	Moser (Twello, Niederlande)
Handzähler	EE53.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Kryostat	HM560 HM	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Kugelmühle	MM400	Retsch (Haan, Deutschland)
Magnetrührer	RCT	IKA (Staufen, Deutschland)
Maulwurfsvertreiber	n.a.	Conrad (Hirschau, Deutschland)
Mikroskope Fluoreszenzmikroskop + Kamera Durchlichtmikroskop	DMI 6000B DFC345 FX 73002	Leica (Wetzlar, Deutschland) Leica (Wetzlar, Deutschland) Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikrowelle	Intellowave	LG (Ratingen, Deutschland)
Nano Drop	ND-1000	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
PCR System	StepOne	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
PCR Werkbank	90-UV/PCR	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
pH-Meter	pH 521	Wissenschaftlich-technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland)
Pipetten	2,5µl, 10µl 100µl, 1000µl, Multi	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	Pipetboy	Integra (Zizers, Schweiz)
Rüttler	VXR	IKA (Staufen, Deutschland)
Sterilwerkbank	HS 18	Thermo Scientific (Walldorf, Deutschland)
Thermoblock	BT 100	Kleinfeld Labortechnik (Gehrden, Deutschland)
Thermocycler	T-Gradient	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Vortexer	REAX top	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Waagen	ABJ 80-4M PJ360	Kern GmbH (Balingen, Deutschland) Mettler (Gießen, Deutschland)
Wasseraufbereiter	Elix 10 UV	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Wasserbad	3047	Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland)

Material und Methoden

Zentrifugen	Rotina 380R Universal 1200 Mikroliter 2020	Hettich (Tuttlingen, Deutschland) Hettich (Tuttlingen, Deutschland) Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
-------------	--	---

2.1.3 Labormaterialien

Tabelle 4 Liste der verwendeten Labormaterialien

Material	Typ	Hersteller
Deckgläser	24x60 mm	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Edelstahlkugeln	7 mm	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Einbettmedium	Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura (Staufen, Deutschland)
Falcon	5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Färbetrog	Assistent 1205	Karl Hecht GmbH (Sondheim, Deutschland)
Fettstift	Dako Pen	Dako (Glostrup, Dänemark)
Feuchtkammer	n.a.	Eigene Konstruktion
Filterkartuschen, steril	0,22 µm 0,45 µm	Merck (Darmstadt, Deutschland) GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Glaswaren	Flaschen, Messzylinder	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Handschuhe	Nobaglove Latex Nitra-Tex KC500	NOBA (Wetter, Deutschland) Ansell (Brüssel, Belgien) Kimberly Clark (Koblenz, Deutschland)
Kanülen, steril	Butterfly-Nadel	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Objektträger	SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Objektträgerbox	50 Objektträger	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Optische Versiegelungsfolie	48-Well	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
PCR-Platten	48-Well	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen unsteril steril	10 µl, 100 µl, 1000 µl 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Präparierbesteck	Verschiedene Scheren, Pinzetten & Skalpelle	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
QIAshredder	QIAshredder	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reaktionsgefäße unsteril steril	0,5 ml, 1 ml, 2 ml 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten, steril	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Silikoneinsatz	flexiPERM	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Spritzen	1 ml, 10 ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Transferpipette, steril	3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer improved Kammertiefe: 0,1 mm Großquadrat: 1 mm ²	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Zellkulturflaschen, steril	CellStar®, 175 cm ²	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)

Material und Methoden

Zellkulturplatten, steril	6-Well	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
---------------------------	--------	--

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5 Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche (Mannheim, Deutschland)
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Agarose	Biozym (Oldendorf, Deutschland)
Aluminiumhydroxid	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure, 99 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Anti-BDNF AK	Promega (Mannheim, Deutschland)
Anti-NGF AK	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Aquadest	Braun (Melsungen, Deutschland)
AR-R 17779	Tocris Bioscience (Bristol, UK)
Diethylcarbonat (DEPC)-Wasser	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNA Gel Loading Dye (6x)	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Leiter	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Eselnormalserum	Dianova (Hamburg, Deutschland)
Esketaminhydrochlorid, 25 mg/ml	Pfizer (Berlin, Deutschland)
Essigsäure, 100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, unvergällt, 100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, vergällt, 100 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fetales Kälberserum	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Fluoresceinisothiocyanat-Avidin (FITC-Avidin)	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Giemsa Azur-Eosin Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
IL-3	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Immersionsöl	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Indocarbocyanin-Avidin (Cy3-Avidin)	Rockland (Limerick, USA)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Longasteril	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Monobasisches Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl), 0,9 %	Braun (Melsungen, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Material und Methoden

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NGF (2.5S, Murine)	Promega (Mannheim, Deutschland)
Ovalbumin Grade V	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ovalbumin Grade VI	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Pikrinsäure	AplliChem (Darmstadt, Deutschland)
ProLong [®] Gold	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
RPMI1640	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Saccharose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SCF	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
SLURP1	Abnova (Walnut, USA)
SP	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) HCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau 0,1 %	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Vitro-Clud [®]	R. Langenbrinck (Emmendingen, Deutschland)
Wasser, steril	Braun (Melsungen, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Xylazinhydrochlorid 2 %	Ceva (Düsseldorf, Deutschland)
α-Monothioglycerol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.1.5 Kits

Tabelle 6 Liste der verwendeten Kits

Name	Bestellnummer	Hersteller
AllPrep [®] Universal Kit	80224	Qiagen (Hilden, Deutschland)
DNase I Kit	18068-015	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
dNTP Mix	10297-018	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
MaxFluor [™] 488 Maus-auf-Maus Immunfluoreszenz Detektionskit	MF01-S	Dianova (Hamburg, Deutschland)
QuantiTect Probe PCR Kit	204343	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Random Primer	48190-011	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
SuperScript II RT	18064-014	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)

Material und Methoden

2.1.6 Medien

Tabelle 7 Liste der hergestellten Medien

Name	Herstellung
PMZK-Medium	Für 235 ml PMZK-Medium: 12,5 ml Fetales Kälberserum + 2,5 µl α-Monothioglycerol + 2,5 ml Penicillin-Streptomycin Mit RPMI auf 235 ml auffüllen

2.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 8 Liste der hergestellten Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
1N Ameisensäure	2,3015 g Ameisensäure 99 % + 100 ml Aquadest
DAPI	Stammlösung: 10 mg DAPI + 2 ml Aquadest Lagerung in Dunkelheit bei -20 °C Gebrauchslösung: Stammlösung 1:5000 in Methanol lösen Lagerung in Dunkelheit bei 4 °C
Giemsa-Lösung	Giemsa Azur-Eosin Methylenblaulösung 1:10 in PBS
Homogenisierungspuffer (RNA-Isolation)	RLTplus-Puffer (aus AllPrep® Universal Kit) + β-Mercaptoethanol 1:100
Homogenisierungspuffer (ACh-Bestimmung)	150 µl 1N Ameisensäure 99 % + 850 µl Aceton
LANA-Lösung	Lösung A: Paraformaldehyd in 125 ml Aquadest bei 58 °C lösen, NaOH zugeben bis die Lösung aufklart, 70 ml Pikrinsäure hinzugeben Mit Aquadest auf 250 ml auffüllen Lösung B: 10,23 g Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat 2,99 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat Mit Aquadest auf 250 ml auffüllen Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen
Narkoselösung	Stammlösung: 800 µl Esketaminhydrochlorid + 200 µl Xylazinhydrochlorid 2 % Gebrauchslösung: Stammlösung 1:2 mit NaCl 0,9 % verdünnen
Phosphat-gepufferte Saline (PBS)	PBS (1x): 16 g NaCl + 0,4 g Kaliumchlorid + 2,88 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat + 0,48 g monobasisches Kaliumphosphat Auf 2 Liter mit Aquadest auffüllen pH-Wert mittels HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen
Saccharose-Puffer	Saccharose-Puffer (27,3%) 273 g Saccharose + 12,46 g Di-Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat + 4,12 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
SDS-Lösung (1%)	1 g SDS + 100 ml TBS

Material und Methoden

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	TAE-Puffer (50x): 242 g Tris + 57,1 ml Essigsäure (100 %) + 100 ml EDTA (0,5 Mol, pH 8,0) Auf 1 Liter mit Aquadest auffüllen und autoklavieren
Tris-gepufferte Saline (TBS)	TBS (1x): 3,6 g Tris + 27,4 g Tris Hydrochlorid + 35,12 g NaCl Auf 4 Liter mit Aquadest auffüllen pH-Wert mittels HCl oder NaOH auf 7,4 einstellen

2.1.8 Primäre Antikörper

Tabelle 9 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper

Abkürzungen: m = monoklonal; p = polyklonal

Antigen	Wirt	Bestellnummer	Verdünnung	Hersteller
CD117 (c-Kit)	Ratte, m	CL042P	1:400	Acris Antibodies (Herford, Deutschland)
ChAT	Huhn, p	NB100-1615	1:100; 1:200; 1:400; 1:800	Novus Biologicals (Littleton, USA)
ChAT	Ziege, p	AB144P	1:100; 1:200; 1:400; 1:800	Millipore (Temecula, USA)
ChAT	Ziege, p	AHP1569	1:100; 1:200; 1:400; 1:800	AbD Serotec (Puchheim, Deutschland)
ChAT	Ziege, p	2080-0000	1:200	AbD Serotec (Puchheim, Deutschland)
Enolase 3	Kaninchen, p	LS-C81180	siehe [263]	Biozol (Eching, Deutschland)
GFP	Kaninchen, p	ab290	1:200	Abcam (Cambridge, UK)
IL-10	Kaninchen, p	250713	1:100	Abbiotec (San Diego, USA)
IL-1 β	Kaninchen, p	ab9722	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
mAChR3	Kaninchen, p	ab41169	siehe [263]	Abcam (Cambridge, UK)
mAChR3	Kaninchen, p	GTX111637	siehe [263]	Genetex (Irvine, USA)
mAChR3	Kaninchen, p	M0194	siehe [263]	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
mAChR3	Ziege, p	sc-31486	siehe [263]	Santa Cruz (Dallas, USA)
mAChR3	Ziege, p	sc-31487	siehe [263]	Santa Cruz (Dallas, USA)
mMCP4	Ziege, p	LS-B5958	1:400	Biozol (Eching, Deutschland)
mMCP6	Ziege, p	AF3736	1:800	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)
nAChR α 7	Kaninchen, p	ab28741	siehe [263]	Abcam (Cambridge, UK)
nAChR α 7	Kaninchen, p	AS-5631S	siehe [263]	R&D Antibodies (Las Vegas, USA)
nAChR α 7	Kaninchen, p	sc-5544	siehe [263]	Santa Cruz (Dallas, USA)
nAChR α 7	Kaninchen, p	ab23832	siehe [263]	Abcam (Cambridge, UK)
nAChR α 7	Ziege, p	ab110851	1:100	Abcam (Cambridge, UK)
SLURP1	Maus, m	MC-6401	1:100; 1:200; 1:400; 1:800	R&D Antibodies (Las Vegas, USA)
SLURP1	Kaninchen, p		1:200	Moriwaki et al. [267]

Material und Methoden

TGF- β	Kaninchen, p	sc-90	1:250	Santa Cruz (Dallas, USA)
TNF α	Kaninchen, p	ab34674	1:200	Abcam (Cambridge, UK)
VACHT	Kaninchen, p	139 103	1:200	Synaptic Systems (Göttingen, Deutschland)
VACHT	Kaninchen, p	H-V006	1:500	Phoenix Europe GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
β -Actin	Kaninchen, p	ab8227	siehe [263]	Abcam (Cambridge, UK)

2.1.9 Sekundäre Antikörper

Tabelle 10 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper

Abkürzungen: Alexa488 = Alexa Fluor 488; Alexa647 = Alexa Fluor 647; Indocarbocyanin = Cy3; p = polyklonal

Antikörper	Spezies	Bestellnummer	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen IgG, Alexa488-gekoppelt	Esel, p	711-546-152	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Kaninchen IgG, Alexa-647 gekoppelt	Esel, p	711-606-152	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Esel, p	711-166-152	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Ziege IgG, Alexa488-gekoppelt	Esel, p	705-546-147	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Ziege IgG, Alexa-647 gekoppelt	Esel, p	705-606-147	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Ziege IgG, Cy3-gekoppelt	Esel, p	705-166-147	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)
anti-Ratte IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege, p	112-026-072	1:200	Dianova (Hamburg, Deutschland)

2.1.10 Blockpeptide

Tabelle 11 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten Blockpeptide

Antigen	Bestellnummer	Verdünnung	Hersteller
ab23832	ab24285	siehe [263]	Abcam (Cambridge, UK)
ab34674	ab151311	1:100; 1:200	Abcam (Cambridge, UK)
sc-31486	sc-31486 P	siehe [263]	Santa Cruz (Dallas, USA)
sc-31487	sc-31487 P	siehe [263]	Santa Cruz (Dallas, USA)

Material und Methoden

2.1.11 Primer

Alle Primer und Sonden wurden bei TIB MolBiol (Berlin, Deutschland) bestellt.

Tabelle 12 Liste der in der qPCR verwendeten Primer und Sonden

Abkürzungen: V = Vorwärts; R = Rückwärts; T = TaqMan-Sonde

Gen	GenBank Nr.	Sequenz
CD117	NM_001122733	V: CCTTTCTGGTGTCCAACCTCTGAT R: AGATACATTCTGGACCTGTACGTCC T: 6FAM-CCAGTGCTTCCGTGACATTCAACGT--BBQ
ChAT	NM_009891	V: CCAGGACGGTCCTCTTAAAAGAC R: CCCTGTGTGTGTCCTGAGGT T: 6FAM-CGGGACTCCCTGGACATGATCGAGC--BBQ
AChE	NM_009599	V: CCTGAACCTGAAGCCCTTAGA R: CAGAGTATCGGTGGCGCTG T: 6FAM-AAAGCGATTCCAGAAGGCGCA--BBQ
BChE	NM_009738	V: GCTTACCTCTGGGAAGAAGAGTTAA R: TCAGTACTTGTGAAGACAGGCCAC T: 6FAM-AGTCGATCCATAATGAAAACCTGGGCAAA--BBQ
IL-10	NM_010548	V: GACTTTCTTTCAAACAAGGACC R: GCTTGGCAACCCAAGTAA T: 6FAM-ACTGCTAACCGACTCCTTAATGCAGG--BBQ
IL-10RB	NM_008349	V: TCACAGCTCAGTATGAAAGTTACAG R: ATTCAGCCCTGACTCTCACAG T: 6FAM-ATCACTGCAAGCGCACTGCCTCG--BBQ
IL-1R1	NM_008362	V: AGGGACAGACCTGTTATCCTG R: CAGATCAGTTGTATCATTGATCCTG T: 6FAM-TCGATCGTCTCATTCCGAGGGC--BBQ
IL-1 β	NM_008361	V: AAAGAATCTATACCTGTCCTGTGT R: GCTTGGGATCCACACTCTCC T: 6FAM-AAGACGGCACACCCACCCTGCAGCT--BBQ
mAChR3	NM_033269	V: GAGTGAACCATATCCTTTCCCATCA R: CTTGGTCACTTGGTCAGAACG T: FAM-CACCACAGAGACTCTCCTCTTGAAGTGCT-BBQ
MZP4	NM_010779.2	V: GGCTGGAGCTGAGGAGATTATT R: AGTGTGCAGCAGTCAACACAAAT T: FAM-CCACTGAGAGAGGGTTCACAGCTACCTGT-BBQ
MZP6	M57625.1	V: GTGCAGCTTCGTGAGCAGT R: GGTGGGAGAGGCTCGTCATTAT T: FAM-AGCTCCTCTCTTTGAACAGGATCGTGGT-BBQ
nAChRa7	NM_007390	V: GCCCTTGATAGCACAGTACTTCG R: GATCCTGGTCCACTTAGGCATTT T: 6FAM-CAGTGGTCGTGACAGTGATTGTGCTGC-BBQ
SLURP1	NM_020519.1	V: GAGCATGGGCTATGGTGAGG R: TTGAAGGGGAACGCTGCTT T: 6FAM-TGCAAGATGGAAGACACAGCCTGTAAGAC--BBQ
TBP	NM_013684.3	V: GTGAATCTTGGCTGTAACTTGACCT R: GCAGTTGTCCGTGGCTC T: 6FAM-AAATGCTGAATATAATCCCAAGCGATTGTC--BBQ
TGF- β	NM_009367	V: GCAAACCCCAAAGCCAG R: GTGGGAGATGTTAAGTCTTTGGA T: 6FAM-TCAATCCGCTGCTCGGCCA--BBQ
TNFR1	NM_011609	V: GTGACAATCCCCTGTAAGGAGAC R: GGCACAACCTTCATACACTCCTCATTT T: 6FAM-ATGCAGGGTCTTTCTGAGAGAAAGTGA--BBQ

Material und Methoden

TNFR5	NM_011611	V: CCCTGTGATTTGGCTCTTCTGA R: GCACGTAACACACTGCCCTAGA T: 6FAM-CGCTGTCAACAAGCAGCCCCATAGC--BBQ
TNF α	NM_013693	V: GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTCATT R: CCACTTGGTGGTTTGCTACGA T: 6FAM-CCATAGAAGTATGAGAGGGAGGCCATTT--BBQ
VACht	NM_021712	V: CCCTTAAGCGGGCCTTTC R: CGAAGAGCGTGGCATAGTCT T: 6FAM-TTGATCGCATGAGCTACGACGTGC--BBQ

2.1.12 Software

Tabelle 13 Liste der verwendeten Software

Name	Hersteller
Endnote X7	Thomson Reuters (New York, USA)
FireCam 8 Bit	PHASE-HL (Lübeck, Deutschland)
LAS-AF	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Office 2013	Microsoft (Redmond, USA)
Photoshop CC 2014	Adobe (San Jose, USA)
Prism 6	GraphPad (San Diego, USA)
SPSS Statistics 22	IBM (Armonk, USA)
StepOne™ Software v.2.3	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Das AID-Stress-Modell

Im Rahmen des AID-Stress-Modells wurden je zehn Mäuse in sechs Gruppen randomisiert (Tabelle 14). Neben einer Kontrollgruppe (Kontrolle) und einer Stress-Gruppe (Stress), gab es vier Gruppen mit provoziertes AID. Dabei wurde zwischen AID (AID) oder AID in Kombination mit Stress (Stress+AID) unterschieden. In zwei Gruppen wurde eine AID induziert und zusätzlich Stress und ein spezifischer anti-NGF AK (Stress+AID+aNGF) oder anti-BDNF AK (Stress+AID+aBDNF) eingesetzt.

Tabelle 14 Behandlungsgruppen im AID-Stress-Modell

Mausstamm	Behandlungsgruppe	Anzahl Tiere (n)
C57BL/6	Kontrolle	10
	Stress	10
	AID	10
	Stress+AID	10
	Stress+AID+aNGF	10
	Stress+AID+aBDNF	10

Nach einer siebentägigen Eingewöhnungszeit erfolgte an Tag 1 des Experiments die Sensibilisierung der Tiere der AID, Stress+AID, Stress+AID+aNGF und Stress+AID+aBDNF Gruppen mittels einer intraperitonealen Injektion von 20 µg Ovalbumin Grade VI und 2,25 mg Aluminiumhydroxid gelöst in 100 µl sterilem PBS. Die zweite Sensibilisierung erfolgte an Tag 14 [262, 268]. Die Tiere der Kontroll- und Stress-Gruppe wurden nicht sensibilisiert. Die Provokation der AID erfolgte an Tag 21 des Experiments durch eine intradermale Injektion von 50 µg Ovalbumin Grade V gelöst in 200 µl sterilem PBS [13, 269]. Vor jedem invasiven Eingriff wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion der Narkoselösung anästhesiert und die Haare der Rückenhaut mit dem Haartrimmer entfernt.

Die Tiere der Stress-Gruppen wurden in den 24 Std. vor der Provokation (Tag 20) durch einen Maulwurfsvertreiber, der viermal pro Min. in unregelmäßigen Abständen einen 300 Hz Ton aussandte, gestresst. Die Unregelmäßigkeit der Abstände ermöglichte den Tieren keine Anpassung und ist Grundlage eines etablierten Lärmstress-Modells [13, 269].

Die Tiere der Gruppen Stress+AID+aNGF erhielten vor Beginn der Stressexposition eine intraperitoneale Injektion von 200 μ l 1:1500 in PBS verdünnten NGF AK. Diese Dosierung basiert auf bereits publizierten Daten [270]. Den Tieren der Stress+AID+aBDNF-Gruppe wurden intraperitoneal 125 μ l anti-BDNF AK injiziert, die 50 μ g/ml anti-BDNF enthielten. Die zweite Injektion erfolgte 30 Min. vor Provokation der AID.

Aufgrund der komplexen Interaktion der NT mit den zugehörigen NTR wurden in diesem Tiermodell NGF und BDNF direkt blockiert. Durch Blockade der Liganden können deren biologisch relevante Interaktionen besser verstanden werden. Der Einsatz eines gendefizienten NGF-KO Tieres war nicht möglich, da diese Mutation letal verläuft [82].

Die Tiere der Stress-Gruppe wurden direkt nach der Stress-Applikation mittels der Narkoselösung anästhesiert und die Rückenhaut rasiert. Bei allen anderen Gruppen erfolgte dies an Tag 23 des Experiments. Anschließend wurden sie entweder durch eine zervikale Dislokation oder mittels Injektion einer letalen Dosis der Narkoselösung getötet.

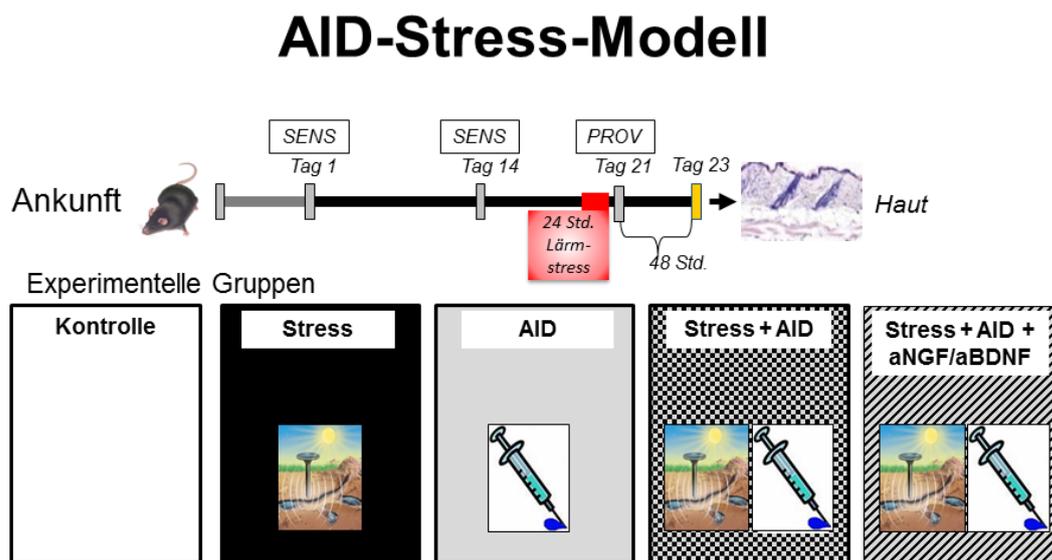


Abbildung 4 Schematische Darstellung des AID-Stress-Modells

Nach einer siebtägigen Eingewöhnungszeit in ihrer neuen Umgebung werden die Tiere der Entzündungsgruppen an Tag 1 und Tag 14 durch intraperitoneale Ovalbumin-Gabe sensibilisiert (SENS). An Tag 21 erfolgt die Provokation (PROV) der AID. Tiere, die dem Stress-Protokoll angehören, werden an Tag 20 (24 Std. vor der Provokation) einem unregelmäßigen Lärmstress ausgesetzt. Die Applikation der Neurotrophin-Blocker (aNGF/aBDNF) unmittelbar vor Beginn der Stressexposition und 30 Min. vor Provokation der AID.

2.2.1.1 Entnahme der Gewebeproben

Tiere, deren Gewebe für die Immunfluoreszenz (IF) bestimmt waren, wurden durch eine intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis Narkoselösung getötet. Mit Einsetzen der Schnappatmung wurde das Tier in Rückenlage fixiert. Nach der Eröffnung des Thorax wurde das Herz freipräpariert und der linke Ventrikel mittels Butterfly-Nadel an der Spitze punktiert. Für eine optimale Zirkulation der Fixierung durch den Körper wurde der rechte Vorhof mit einer Schere eröffnet. Es folgte die Spülung mit 20 ml Longasteril (alternativ sterile, 6%ige HydroxyethylstärkeLösung) zum Erreichen der Blutleere mit anschließender Injektion von 40 ml LANA-Lösung zur Fixierung des Gewebes. Nach abgeschlossener Perfusionsfixierung folgte das Entfernen der Rückenhaut unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Schere und eines Skalpells. Die entnommene Biopsie wurde zwei Std. in LANA-Lösung nachfixiert und je eine Nacht in einem 10%igen, 15%igen und 27,3%igen Saccharose-Puffer gelagert. Im Anschluss folgten das Einbetten des Gewebes und die Lagerung bei -80 °C.

Tiere, deren Gewebe für die Untersuchungen im Microarray oder mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) gedacht waren, wurden durch intraperitonealer Gabe von Narkoselösung anästhesiert, die Rückenhaut rasiert und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Im Anschluss erfolgten das Entfernen der Rückenhaut nach dem bereits oben beschriebenen Verfahren und das unmittelbare Schockfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Weitere Organentnahmen

Die Gewinnung der Hautproben von $\alpha 7$ -KO, m3-KO und ChAT-eGFP Mäusen erfolgte, je nach geplanter Untersuchung, mit den oben beschriebenen Methoden und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kummer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen (siehe 2.2.1.1).

2.2.3 Genotypisierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten $\alpha 7$ -KO und m3-KO Tiere wurden, wie bereits in der Literatur beschrieben, genotypisiert [271]. Die PCR wurde mit 0,5 μ g DNA nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Peritoneale Mastzellkultur

2.2.4.1 Gewinnung der Mastzellen

An Tag 0 des Experiments erfolgte die Gewinnung der MZ im Rahmen der PMZK in Anlehnung an bereits etablierte Protokolle, wurde jedoch in einigen Punkten modifiziert [137, 272]. Im Detail wurden für die Gewinnung der peritonealen MZ die Tiere zunächst mittels intraperitonealer Anästhesie betäubt und anschließend durch eine zervikale Dislokation getötet. Nach Todeseintritt erfolgten die Desinfektion, ein kleiner Einschnitt in die Bauchhaut und das stumpfe Abpräparieren der Haut bis das Peritoneum freigelegt war. Dabei sollte das Peritoneum nicht verletzt werden. Anschließend wurden mit einer Spritze langsam 5 ml NaCl 0,9 % und 5 ml Luft in die Bauchhöhle injiziert. Dabei ist es wichtig, die inneren Organe nicht zu verletzen, um eine Kontamination der peritonealen Lavage zu verhindern. Zur Lösung der Zellen wurde die peritoneale Lavage für 3 Min. in Rückenlage durch Absenken und Anheben des Kopfes und sanfte Massage des Bauches durchgeführt. Nach 3 Min. folgten das Eröffnen des Peritoneums mit einem 1 cm langen Schnitt und das vorsichtige Absaugen der injizierten Flüssigkeit mit Hilfe einer stumpfen Nadel. Die gewonnene Lavage wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 4 °C für das weitere Prozedere aufbewahrt.

2.2.4.2 Kultivierung der Mastzellen

Die peritoneale Lavage wurde bei 4 °C mit 1200 Umdrehungen pro Min. (U/Min.) zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter einer Sterilwerkbank. Während der Zentrifugation wurde dem zuvor angesetzten und im Brutschrank auf 37 °C vorgewärmten PMZK-Medium IL-3 (Endkonzentration: 10 ng/ml) und SCF (Endkonzentration: 30 ng/ml) zugegeben. Durch die Zentrifugation der Lavage bildete sich am Boden des Falcons ein Pellet. Der Überstand wurde unter Erhaltung des Pellets abpipettiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte mit 5 ml des mit IL-3 und SCF versetzten PMZK-Mediums. Hierbei wurden die Zellen mit Hilfe einer sterilen Transferpipette vorsichtig und langsam durchmischt bis das Pellet aufgelöst war. Nach erfolgreicher Resuspendierung wurde die Lösung in eine sterile Zellkulturflasche überführt und mit leicht geöffnetem Verschluss bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank aufrecht stehend gelagert.

An Tag 2 des Experiments wurde das PMZK-Medium der Kultur gewechselt. Hierbei ist zu beachten, dass das PMZK-Medium wieder vorgewärmt und mit IL-3 und SCF versetzt werden muss. Die Zellkulturflaschen wurden aus dem Brutschrank entnommen und die weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die 5 ml Zellsuspension aus der

Zellkulturflasche wurde in ein Falcon überführt, anschließend 3 ml frisches PMZK-Medium in die Flasche überführt, um noch vorhandene Zellen zu versorgen. Die gewonnene Zellsuspension wurde bei RT und 1200 U/Min. für 2 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 2 ml frischem PMZK-Medium resuspendiert und anschließend in die Zellkulturflasche rückgeführt. Dieser Vorgang wurde an Tag 5 und 8 wiederholt. Bei besonders hohen Zellzahlen war ein vorzeitiger oder zusätzlicher Mediumwechsel erforderlich. Die Stimulation der Zellen erfolgte frühestens zwei Tage nach dem letzten Mediumwechsel.

2.2.4.3 Zellernte

An Tag 10 wurden die MZ unter sterilen Bedingungen aus den Zellkulturflaschen in 15 ml Falcons überführt und diese für 2 Min. in RT mit 1200 U/Min. zentrifugiert. Anschließend folgten das vorsichtige Entfernen des Überstandes und die Resuspendierung des Pellets in 2 ml PMZK-Medium mit IL-3 und SCF. Nach der Probenentnahme für die Bestimmung der Zellzahl (siehe 2.2.4.4) und Überprüfung der Reinheit der PMZK (siehe 2.2.4.5) wurde die restliche Zellsuspension für das weitere Prozedere für 15 Min. mit 1200 U/Min. bei RT zentrifugiert.

2.2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden aus der resuspendierten Zelllösung 10 μ l entnommen und in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 1:2 mit 10 μ l 0,1%igem Trypanblau vermischt.

Es folgte die Reinigung der Zählkammer mit 70%igem Ethanol, die Befeuchtung des Deckglases mit Aquadest und dessen Adhäsion an der Zählkammer. 10 μ l der MZ-Trypanblau Lösung wurden in die Zählkammer überführt und unter dem Lichtmikroskop die Zellen ausgezählt. Der Mittelwert aus vier gezählten Quadranten wurde anschließend auf die Zellzahl/ml umgerechnet. Die Zellzahl wurde wie folgt bestimmt:

Ringförmig gefärbte Zellen $\times 10^4$ (Konstante Neubauerkammer) $\times 2$ (Verdünnung MZ-Trypanblau Lösung) $\times 2$ (in 2 ml Medium resuspendierte Zellen) = Zahl der lebenden Zellen pro 2 ml

Lebende Zellen bewahren die Integrität ihrer Zellmembran und reichern den Farbstoff ringförmig an, tote Zellen hingegen verlieren die Membranintegrität und der Farbstoff diffundiert in die gesamte Zelle.

In Abhängigkeit der hierbei bestimmten Zellzahl wurde das Pellet der restlichen Zellsuspension mit einem angepassten Volumen von PMZK-Medium mit IL-3 und SCF

resuspendiert. Dabei sollte eine Zellkonzentration von 100.000 Zellen/100µl erreicht werden.

2.2.4.5 Bestimmung der Reinheit

Zur Überprüfung, ob es sich bei den kultivierten Zellen um MZ handelte, wurden Zytospins erstellt (siehe 2.2.11.1). Zur Differenzierung der kultivierten Zellen wurden diese mittels Giemsa-Färbung markiert (siehe 2.2.11.2). Anschließend wurden die MZ nach ihrer typischen granulären Morphologie und ihrem Färbemuster beurteilt (siehe Abbildung 5). Um die Reinheit der PMZK zu beurteilen wurden pro Zytospin alle Zellen in je neun Gesichtsfeldern ausgezählt und der prozentuale Anteil der MZ errechnet.

Des Weiteren folgte die immunhistochemische Markierung des von MZ exprimierten CD117 (c-Kit) (siehe Abbildung 5). Zusätzlich wurden die MZ mit FITC-Avidin gefärbt [273]. Alle Färbungen wurden nach einem etablierten Färbeprotokoll für immunhistochemische Färbungen durchgeführt (siehe 2.2.12.2).

Mit dem hier beschriebenen Protokoll zur Gewinnung und Kultivierung von peritonealen MZ konnte eine Reinheit von 50 – 70% erreicht werden.

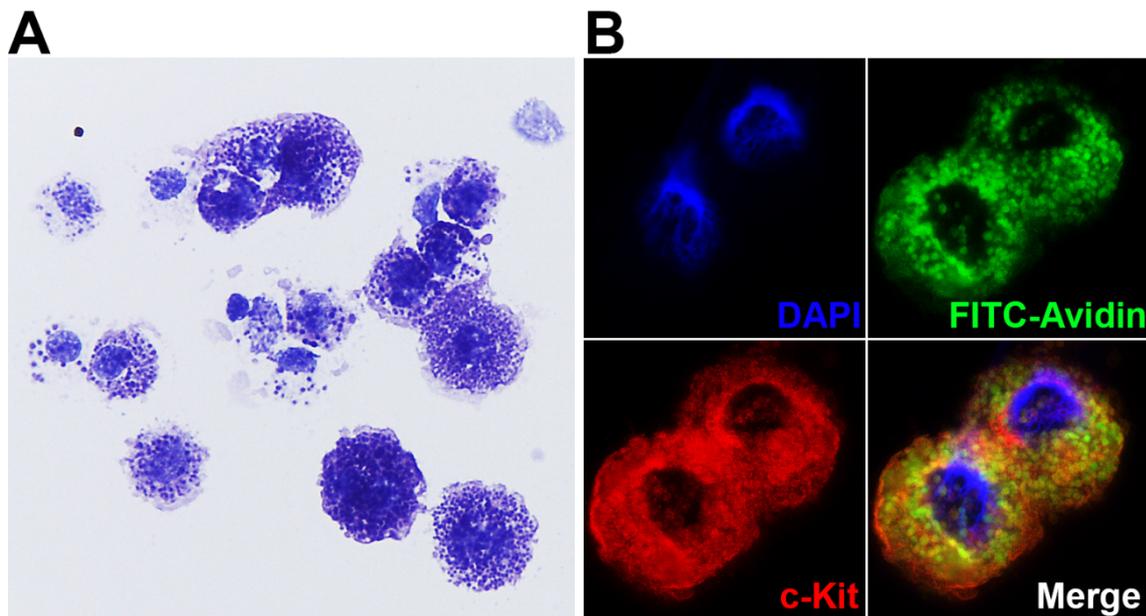


Abbildung 5 Histochemische und immunhistochemische Markierung kultivierter Mastzellen

(A) Exemplarisches Bild mehrerer mittels Giemsa-Färbung markierter Mastzellen. Die metachromatischen Granula der Mastzellen färben sich hierbei violett-lila, die Zellkerne färben sich blau-dunkelblau. (B) Exemplarische Bilder zweier mittels Immunfluoreszenz markierter Mastzellen. Die FITC-Avidin (Grün) Färbung zeigt die granuläre Struktur der MZ, gleichzeitig wird c-Kit (Rot) auf den Mastzellen exprimiert.

2.2.4.6 Behandlung der Mastzellen

Für die Behandlung der MZ im Rahmen der PMZK wurde zunächst PMZK-Medium auf 37 °C vorgewärmt, mit IL-3 und SCF versetzt und anschließend 4 ml in jedes Well der Zellkulturplatte gegeben. Es folgte die Zugabe von 300.000 Zellen/Well und das Auffüllen jedes Wells auf insgesamt 5 ml mit PMZK-Medium. Nach 30 Min. Ruhe bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wurden die für die Stimulation verwendeten Substanzen in jedes Well gegeben (Tabelle 15). Dabei wurden die in Tabelle 16 sichtbaren Behandlungsgruppen gebildet. Nach Zugabe der Substanzen wurden die MZ für 24 Std. im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 15 In der peritonealen Mastzellkultur verwendete Substanzen

Substanz	Konzentration	Typ
SP	1 µM	Stressmediator
SLURP1	5 ng/ml	endogener, allosterischer nAChRα7-Ligand

Tabelle 16 Behandlungsgruppen in der peritonealen Mastzellkultur

Mausstamm	Behandlungsgruppe	Substanz(en)	Dauer (Std.)
Wt	Wt	-	24
α7-KO	α7-KO	-	24
Wt	Wt SLURP1	SLURP1	24
α7-KO	α7-KO SLURP1	SLURP1	24
Wt	Wt SP	SP	24
α7-KO	α7-KO SP	SP	24
Wt	Wt SLURP1 + SP	SLURP1 + SP	24
α7-KO	α7-KO SLURP1 + SP	SLURP1 + SP	24

2.2.4.7 Gewinnung der behandelten Mastzellen

Nach der Inkubation wurden die Zellkulturplatten aus dem Brutschrank entnommen. Die weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Im ersten Schritt wurden die Zellen aus jedem Well in ein Falcon überführt. Dabei war es wichtig, dass die Zellen zunächst durch mehrfaches, langsames Auf- und Abpipettieren durchmengt wurden. Nach Überführung wurden die Falcons bei 1200 U/Min. für 5 Min. bei RT zentrifugiert. Es folgten das vorsichtige Entfernen von 4 ml Überstand, die vorsichtige Resuspension

des Pellets und eine erneute dreiminütige Zentrifugation. Anschließend wurde der übrige Überstand ohne Berührung des Pellets entfernt und dieses bei -80 °C gelagert.

2.2.5 RNA-Isolation

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien wurden zunächst mit der Kugelmühle und unter stetiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff zu einem feinen Puder verarbeitet. Dieser Schritt war notwendig, um die Integrität der Probe aufzuheben. Dabei war es wichtig, dass alle Gefäße und die Edelstahlkugeln bereits mit flüssigen Stickstoff vorgekühlt sind. Die Zertrümmerung des Gewebes erfolgte mit zwei 7mm Edelstahlkugeln für 1,5 Min. bei 25 Hertz. Ein Teil (ca. 15 mg) des entstandenen Puders wurde anschließend in 500 µl Homogenisierungspuffer für die ACh-Bestimmung gelöst (siehe 2.2.7). Der übrige Puder wurde sofort im Homogenisierungspuffer für die RNA-Isolation gelöst. Hierbei musste beachtet werden, dass die Menge des Homogenisierungspuffers an die Menge der Probe adaptiert wird. Die bei der PMZK gewonnenen Pellets wurden zunächst in 4 °C für 15 Min. aufgetaut und anschließend im Homogenisierungspuffer resuspendiert. Alle für die RNA-Isolation gelösten Proben wurden mittels QIAshredder bei 13000 U/Min. für 2 Min. aufgereinigt. Im Rahmen des Herstellerprotokolls für das verwendete AllPrep[®] Universal Kit erfolgte anschließend die RNA-Isolation. Die RNA-Konzentration und die Reinheit der Probe wurden mittels Nano Drop bestimmt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6 Gelelektrophorese

Die Durchführung der Gelelektrophorese diente der Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Isolation und zur Ermittlung deren Qualität.

2.2.6.1 Gelherstellung

Für die Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (1x) bis zur vollständigen Lösung in einer Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde 1 µl 1%iges Ethidiumbromid zugegeben. Es folgte das Eingießen des Gels in die Gelelektrophorese-Kammer und das Einbringen der Kämme zur Bildung der benötigten Probenaschen. Anschließend konnte das Geld für 20 Min. abkühlen.

2.2.6.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Während des Abkühlens wurden in einem Reaktionsgefäß je 10 µl des RNA-Eluats mit 2 µl Ladepuffer (DNA Gel Loading Dye) vermischt. 10 µl dieses Gemisches wurden in jede Geltasche geladen. Die äußeren Geltaschen wurden mit 5 µl DNA-Leiter (Bandbreite: 100-12000 Basenpaare) geladen. Bei konstanten 150 Volt wurde die

Gelelektrophorese für 25 Min. gestartet. Das Gel wurde aus der Form entnommen und in der Geldokumentationskammer unter UV-Licht fotografiert und digital gespeichert.

2.2.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Bestimmung der ACh-Konzentration im Rahmen des AID-Stress-Modells erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Klein vom Institut „Pharmakologie für Naturwissenschaftler“, Fachbereich 14, Goethe Universität Frankfurt am Main. Die Grundlage für die ACh-Bestimmung bildete dabei ein bereits durch diese Arbeitsgruppe etabliertes Verfahren [274, 275].

2.2.8 Microarray-Analyse

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten der Microarray-Analyse stammen aus einem bereits durchgeführten Experiment von Pavlovic et. al. [13]. Zur Durchführung der Microarray-Analyse wurde RNA von insgesamt drei Mäusen der Kontroll- und Stress-Gruppe gepoolt, in cDNA transkribiert und mit dem Microarray Gene Chip Mouse Genome 430A 2.0 nach Herstellerprotokoll hybridisiert. Die Expressionslevel wurden mittels Affymetrix[®] Microarray Suite und GCOS 1.4 analysiert. Die Gene wurden anschließend mittels NetAFFX Analyse Center bestimmt (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>).

2.2.9 DNA-Verdau und cDNA-Synthese

Die Herstellung der *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) aus zuvor isolierter RNA wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.9.1 DNA-Verdau

Vor Beginn des DNA-Verdaus wurde anhand der gemessenen RNA-Konzentration die benötigte Menge des RNA-Eluats errechnet. Der Reaktionsansatz für maximal 4 µg RNA setzte sich aus 32 µl RNA-Eluat, 4 µl DNase I Reaktionspuffer und 4 µl DNase I zusammen. Bei einer höheren RNA-Konzentration im Eluat wurde dieses zuvor mit DEPC-Wasser verdünnt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend im Thermocycler für 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde jedem Reaktionsansatz 4 µl 25 mM EDTA zugegeben und dieser für weitere 10 Min. bei 65 °C im Thermocycler inkubiert. Alle verwendeten Chemikalien waren im DNase I Kit enthalten. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend sofort auf Eis gelagert.

2.2.9.2 cDNA-Synthese

Für die nach dem DNA-Verdau folgende reverse Transkription erfolgte die Zugabe von 4 µl Random Primer und 4 µl dNTP Mix zum Reaktionsansatz und die Inkubation im Thermocycler für 5 Min. bei 65 °C. Nach Zugabe von 16 µl First Strand Buffer und 8 µl 0,1 M DTT (beide im Superscript II RT Kit enthalten) folgten weitere 2 Min. Inkubation bei 25 °C. Die reverse Transkription wurde nach Zugabe von 4 µl Superscript II RT durchgeführt. Das verwendete Thermocycler-Profil war: 10 Min. 25 °C; 50 Min. 42 °C; 15 Min. 70 °C. Die langfristige Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung definierter Bereiche der DNA. Im ersten Schritt erfolgt dabei die Denaturierung der DNA. In der Folge können sich spezifische Primer an die DNA anlagern. Primer sind kleine Oligonukleotide, die den definierten DNA-Bereich flankieren und den Startpunkt der DNA-Polymerase bilden. Die DNA-Polymerase ist das Schlüsselenzym der PCR und ist für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges zuständig. Durch das beidseitige Flankieren des gewünschten DNA-Bereiches mittels spezifischer Vorwärts- und Rückwärts-Primer kommt es zu einer Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts.

Grundsätzlich wird die PCR in drei Schritte eingeteilt: 1. Denaturierung der DNA 2. Anlagerung der Primer (Annealing) und 3. Elongation und Vervielfältigung des definierten Abschnitts. Durch zyklische Wiederholungen dieses Ablaufs kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Zielgens.

2.2.10.1 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die in dieser Arbeit verwendete qPCR beruht auf dem Prinzip der PCR, ermöglicht jedoch auch die zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA in Echtzeit. Die Quantifizierung wird durch Fluoreszenz, die in Echtzeit erfasst wird, erreicht. Nach der Denaturierung der Doppelstrang-DNA bindet, neben den beiden spezifischen Vorwärts- und Rückwärts-Primern, die sogenannte TaqMan-Sonde. Diese ist mit zwei Farbstoffen markiert, einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff und einem sog. Quencherfarbstoff, welcher den Reporterfarbstoff inaktiviert. Bindet die Sonde an die Zielsequenz, wird sie durch die DNA-Polymerase hydrolysiert, die Reporter-Fluoreszenz abgespalten und aktiviert. Je mehr Amplifikate entstehen, umso stärker wird das Signal des fluoreszierenden Reporterfarbstoffs [276].

2.2.10.2 Expressionsanalyse mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Die bei -20 °C gelagerte cDNA und der QuantiTect Probe PCR Master Mix aus dem QuantiTect Probe PCR Kit wurden vor Beginn der qPCR bei 4 °C aufgetaut. Der gesamte Arbeitsablauf der qPCR erfolgte steril unter der PCR Werkbank und unter Vermeidung von Helligkeit. Zu Beginn erfolgte die Herstellung eines Reaktionsgemisches nach Herstellerangaben (Tabelle 17). Anschließend wurden je 25 µl dieser Lösung in jedes Well der PCR-Platte pipettiert, die 48-Well Platte mit einer optischen Versiegelungsfolie verschlossen, mit einem Vortexer gemischt und für 2 Min. bei 1200 U/Min. zentrifugiert. Nach visueller Kontrolle auf gleichmäßige und luftblasenfreie Füllung aller Wells wurde die qPCR gestartet.

Tabelle 17 Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsgemisches

Substanz	Menge
DEPC-Wasser	10,7 µl
PCR Master Mix	12,5 µl
Primerpaar	je 0,5 µl
Sonde	0,3 µl
cDNA	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

Alle in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analysen wurden mit einem einheitlichen Thermocycler-Profil durchgeführt (Tabelle 18).

Tabelle 18 Thermocycler-Profil der durchgeführten qPCR

Wiederholungen	Schritt	Zeit	Temperatur
1x	Enzymaktivierung	15 Min.	95 °C
50x	Denaturierung	15 Sek.	95 °C
	Annealing & Elongation	30 Sek.	60 °C

Die ermittelten Genexpressionen wurden zur internen Kontrolle, dem *TATA box binding protein* (TBP), mit Hilfe einer modifizierten Version der $\Delta\Delta$ CT-Methode normalisiert [277]. Die Ergebnisse werden als *Fold Change* dargestellt und beschreiben die normalisierte Expressionsrate des Zielgens als Vielfaches des Kontrollgens. Dabei wurden die Mittelwerte der Kontrollgruppen gleich 1 gesetzt.

2.2.11 Histochemie

Die Histochemie dient zum Nachweis bestimmter Zellen oder einzelner Zellorganellen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften. Sie ermöglicht eine Analyse biologischer Strukturen und Funktionen.

2.2.11.1 Herstellung der Zytospins

Für die Herstellung der Zytospins wurde zunächst ein Silikoneinsatz mit mehreren Kompartimenten auf einem Objektträger (OT) durch Druck fixiert und anschließend je 100 µl der Zellsuspension in die Öffnungen pipettiert. Zur Fixierung der Zellen am OT wurde dieser für 3 Min. bei RT mit 2000 U/Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Suspension abpipettiert. Es folgten 10 Min. Trocknung bei RT, das Entfernen des Silikoneinsatzes und weitere 10 Min. Trocknungszeit bei RT. Anschließend wurden die OT in -20 °C kaltem Aceton für 10 Min. unter einem Abzug fixiert und trockneten weitere 30 Min. unter diesem. Die OT wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.11.2 Giemsa Färbung

Die bei -20 °C gelagerten Zytospins wurden nach ihrer Entnahme für 30 Min. bei RT getrocknet und für 5 Min. in PBS gewaschen. Anschließend folgte ihre Inkubation in 1:10 mit PBS verdünnter Giemsa-Lösung für 30 Min. bei RT. Die OT wurden nun in Aquadest gespült bis keine sichtbaren Farbwolken mehr abgingen und zur Differenzierung kurz in 0,2%ige Essigsäure getaucht. Es folgte die Überprüfung der Färbung mittels Lichtmikroskop. Dabei sollten sich Zellkerne blau anfärben, die Granula der MZ in einem Lila bis Rosa. Bei zu intensiver Färbung wurden die OT kurz in 0,2%ige Essigsäure getaucht. Sollten sie noch nicht ausreichend gefärbt sein, wurden sie erneut in Giemsa-Lösung gegeben. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der OT mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 95 % und 100 %) für je maximale 20 Sek. bei RT. Die OT wurden dann je zweimal 5 Min. in Xylol fixiert und mit Vitracemid eingedeckelt. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.12 Immunhistochemie

Neben dem Nachweis der in dieser Arbeit untersuchten Gene auf molekularbiologischer Ebene sollte deren Lokalisation und die möglicherweise veränderte Expression im Rahmen des AID-Stress-Modells untersucht werden. Hierfür wurde die Immunhistochemie genutzt. Die Immunhistochemie beschreibt eine Methode, die den

spezifischen Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten AK ermöglicht. Sind an diese AK fluoreszierende Farbstoffe gebunden, spricht man von IF.

2.2.12.1 Herstellung der Gewebeschnitte

Für die IF wurden 14 µm und 8 µm Gewebeschnitte mit dem Kryostaten angefertigt und auf die OT aufgetragen. Die Temperatur des fixierten Gewebes lag dabei bei -22 °C, die des Messers bei -24 °C. Anschließend wurden die Schnitte 2 Std. bei RT luftgetrocknet und bei -20 °C in einer Objektträgerbox gelagert.

2.2.12.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Schnitte wurden zunächst für 30 Min. luftgetrocknet und währenddessen mit einem Fettstift umrundet. Anschließend 3 x 5 Min. in einem Färbetrog mit TBS gewaschen. Zur Reduktion unspezifischer Färbungen wurden sie 30 Min. mit 5% Normalserum der Wirtspezies des sekundären AK, gelöst in TBS, inkubiert. Die primären AK wurden in TBS mit 0,3% Triton X-100 und 2% Normalserum verdünnt und für 24 Std. bei 4 °C in einer dunklen Feuchtkammer auf den Schnitten inkubiert (siehe Tabelle 9). Zusätzlich zu diesem Standardverfahren wurden alle AK mit einer vorangegangenen Antigendemaskierung mittels 1%iger SDS-Lösung, gelöst in TBS, für 5 Min. getestet [278]. Ab dieser Stelle im Färbeprotokoll erfolgten alle weiteren Schritte unter Vermeidung von Lichtexposition. Der sekundäre AK wurde 1:200 in TBS verdünnt und für 1 Std. bei 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 10). Nach 3 x 5 Min. Waschen in TBS wurden die Schnitte mit 1:5000 in TBS verdünnten FITC-Avidin für die MZ-Färbung für 20 Min. bei 37 °C inkubiert, 3 x 5 Min. in TBS gewaschen und anschließend die Zellkerne 5 Min. in der DAPI-Gebrauchslösung gegengefärbt [273, 279]. Abschließend wurden die Schnitte 3 x 5 Min. gewaschen. Das Eindeckeln erfolgte mit ProLong® Gold. Nach 24 Std. Trocknung bei RT wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

Alle Färbungen wurden mindestens drei Mal wiederholt. Standardkontrollen wurden mittels Weglassen des primären AK, Inkubation mit Maus IgG anstatt des primären AK oder durch Präinkubation mit spezifischen Blockpeptiden durchgeführt (siehe Tabelle 11). Zusätzlich dienten Gewebeproben von α7-KO und m3-KO Tieren als Kontrollen [263].

Die IF-Färbungen wurden mit einem Leica DMI 6000B bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet. Hierbei wurden pro Schnitt je zehn Gesichtsfelder der relevanten Region analysiert. Bei Verwendung der 630-fachen Vergrößerung wurde zusätzlich Immersionsöl verwendet. Die Dokumentation erfolgte mittels Leica DFC345 FX. Die Bilder wurden in Photoshop CC 2014 weiter prozessiert.

Färbungen mit AK, die in Mäusen generiert wurden, wurden nach dem Herstellerprotokoll des MaxFluor™ 488 Maus-auf-Maus Immunfluoreszenz Detektionskits durchgeführt.

2.2.13 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Analysen wurden mit Hilfe von SPSS Statistics 22 und Graphpad Prism 6 berechnet. Alle Mittelwerte eines Parameters wurden zunächst mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) verglichen. Anschließend erfolgte der Vergleich der einzelnen, unabhängigen Gruppen durch einen Mann-Whitney U Test.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ wurde als signifikant und $p \leq 0,01$ bzw. $0,001$ als hochsignifikant angesehen. In den einzelnen Abbildungen wurde für jede Gruppe der Mittelwert plus Standardfehler dargestellt. Dabei gilt $*$ = $p \leq 0,05$ oder $**$ = $p \leq 0,01$.

3 Ergebnisse

3.1 Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiierter Gene in der Haut: Microarray-Analyse

Um erste Hinweise auf eine mögliche Stress-bedingte Regulation NNCS-assoziiierter Gene in muriner Haut zu erhalten wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt (Abbildung 6).

Die schematische Aufarbeitung des Microarrays ergab erste Hinweise auf die in die Stressantwort involvierten Signalwege. Die Untersuchung der jeweiligen Gene offenbarte eine stressabhängige Regulation innerhalb NNCS-relevanter Zielstrukturen. Das NNCS scheint im dargestellten System eine übergeordnete, regulative Rolle einzunehmen. Im Zentrum stehen dabei ACh und nAChR α 7. Für beide konnten bereits in der Literatur inhibierende Einflüsse auf im Downstream befindliche Strukturen gezeigt werden [172, 280, 281]. Interessant ist hierbei, dass vorwiegend nAChR direkten Einfluss auf die relevanten Zielstrukturen nehmen, die mAChR hingegen indirekt die Signalwege beeinflussen. Im Detail zeigte sich, dass der durch TNF α aktivierte TNFR1 in der Haut lärmgestresster Tiere herunterreguliert wird. Die verminderte Expression von TNFR1 steht für eine Abnahme der TH1-Immunität, gleichzeitig spricht die Zunahme des durch B-Zellen exprimierten TNFR5 für eine Zunahme der TH2-Immunität. Passend hierzu zeigte sich im Microarray eine reduzierte Expression des TH1-spezifischen Zytokins IL-1 β und eine gesteigerte Expression des TH2-Zytokins TGF- β (Tabelle 19).

Tabelle 19 Zusammenfassung der wichtigsten Microarray-Ergebnisse

Gen	Entrez ID Affymetrix	Fold Change (Stress vs. Kontrolle)
IL-1 β	49399	-0,140
TGF- β	23250	1,179
TNFR1	48951	-2,576
TNFR5	49473	1,194

Ergebnisse

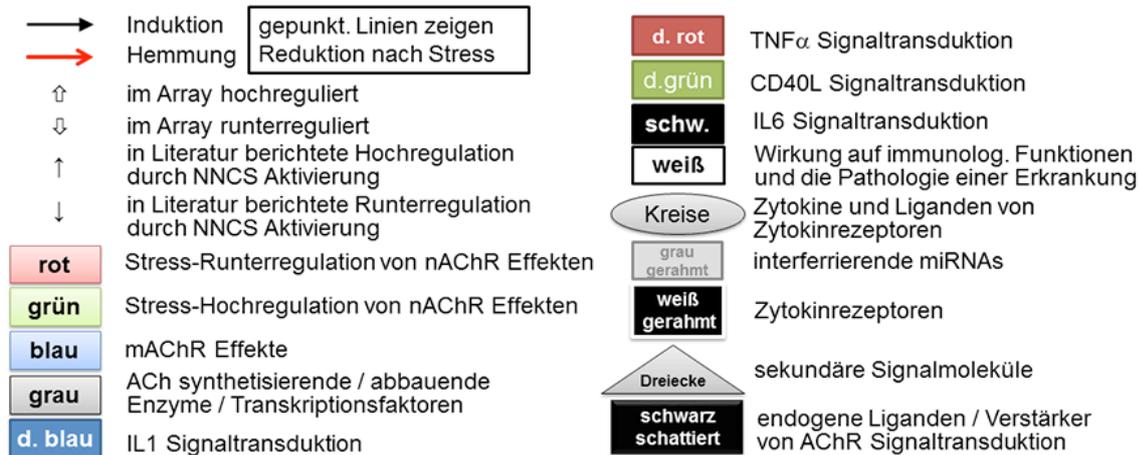


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Microarray-Analyse

Die Hautbiopsien von je drei Tieren der Kontroll- und Stress-Gruppe des AID-Stress-Modells wurden gepoolt und wie unter Kapitel 2.2.8 beschrieben verarbeitet und analysiert. Die schematische Darstellung zeigt die aus der Literatur bekannten und durch die Signalweg-Analyse detektierten komplexen Zusammenhänge der unterschiedlichen Signalwege und die Regulation der mit dem NNCS-assoziierten Gene unter Stress. Der Fokus liegt hierbei vor allem auf den IL-1, TNFR1 und TNFR5 Signalwegen. Die unter Stress gemessenen Expressionsveränderungen wurden mit der Expression der Kontrollgruppe verglichen. Der Fold Change wird unterhalb des Gens dargestellt. Die Pfeile signalisieren die stressabhängige Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.2 Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiierter Gene in der Haut: qPCR

3.2.1 Acetylcholin-Stoffwechsel

Um einen detaillierteren Einblick in den Einfluss von Stress und AID auf die Regulation des NNCS der Haut zu erhalten, wurden die Expressionen relevanter Gene in der Haut mittels qPCR analysiert.

Das ACh produzierende Enzym ChAT zeigte keine veränderte Expression in gestresster Haut. Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es in AID-Tieren zu einer Herunterregulation des Enzyms ($p=0,0079$). Zusätzlicher Stress führte in der AID-Gruppe zu einer tendenziellen Hochregulation der ChAT ($p=0,0873$). Das Blocken von NGF und BDNF hatte keinen Einfluss auf die ChAT Expression in der Haut (Abbildung 7 A).

Für VACHT zeigte sich keine durch Lärmstress oder die AID bedingte Regulation. In der Haut gestresster AID-Tiere erhöhte sich der VACHT mRNA-Level im Vergleich zur AID-Gruppe ($p=0,0079$). Der zusätzliche Block von NGF hatte keinen Einfluss, jedoch

Ergebnisse

verstärkte der Block von BDNF die bereits für Stress+AID eingetretene Hochregulation ($p=0,0079$) (Abbildung 7 B).

Für die AChE konnte keine Veränderung der Genexpression in Tieren der Stress- oder AID-Gruppe nachgewiesen werden. Die Kombination aus Stress und AID regulierte die AChE herauf ($p=0,0079$), die zusätzliche Gabe eines NGF AK hob diesen Effekt auf ($p=0,0079$). Das Blocken von BDNF zeigte keinen Einfluss auf die Hochregulation der AChE (Abbildung 7 C).

Auf die Expression der BChE zeigte Stress keinen Einfluss, in der AID-Gruppe kam es jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Herunterregulation ($p=0,0317$). Die Kombination von Stress und AID resultierte in einer Hochregulation der BChE im Vergleich zur AID allein ($p=0,0079$). Das Blockieren von NGF induzierte keine signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zur Stress+AID Gruppe, jedoch konnte für den Block von BDNF ein abfallender Trend der Expression beobachtet werden ($p=0,0556$) (Abbildung 7 D).

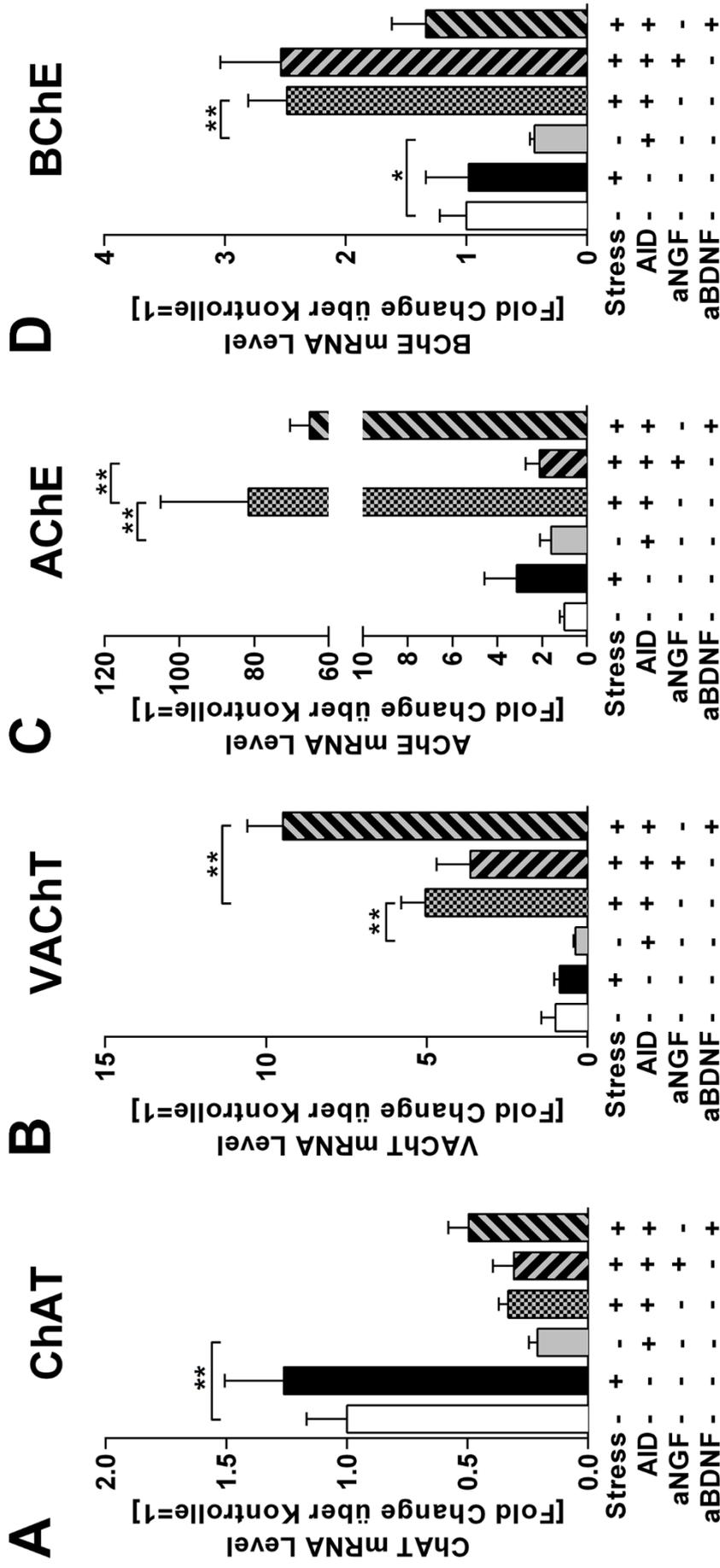


Abbildung 7 qPCR Analyse der Schlüsselspieler des Acetylcholin-Stoffwechsels in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression der cholinergen Schlüsselspieler ChAT, VAcHT, AChE und BChE in der Haut analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

3.2.2 Acetylcholin-Rezeptoren

Im Vergleich mit Tieren der Kontrollgruppe zeigte nAChR α 7 eine signifikante Hochregulation in der Haut gestresster Tiere ($p=0,0079$). In Tieren der AID-Gruppe konnte kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zusätzlicher Stress in AID-Haut resultierte in einer Steigerung der nAChR α 7 Expression im Vergleich zu Tieren der AID-Gruppe ($p=0,0079$). Wurde NGF geblockt, kam es zur Aufhebung dieses Effektes ($p=0,0079$), der Block von BDNF zeigte keinen Einfluss auf die in der Stress+AID-Gruppe gemessenen mRNA-Level (Abbildung 8 A).

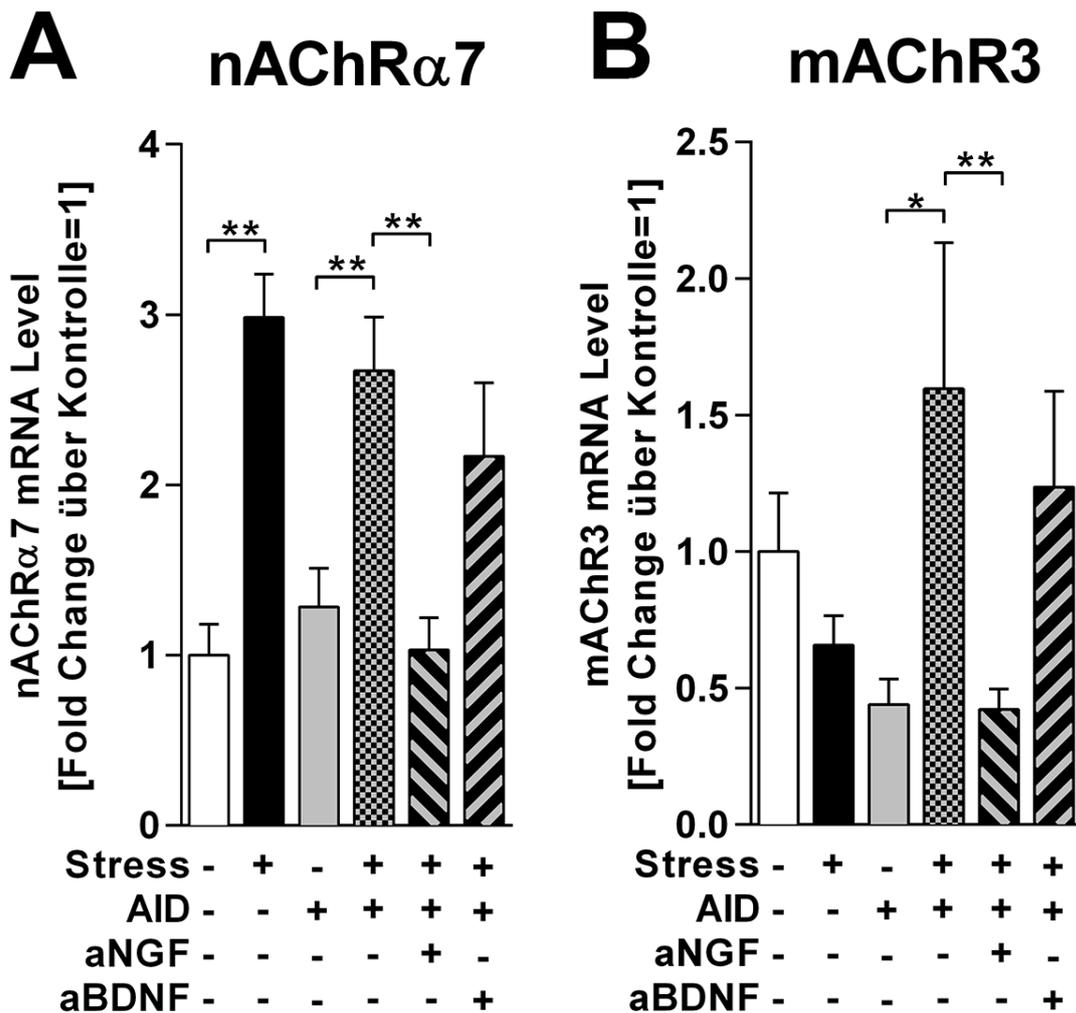


Abbildung 8 qPCR Analyse von nAChR α 7 und mAChR3 in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression der Acetylcholin-Rezeptoren nAChR α 7 und mAChR3 in der Haut analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$.

Stress allein nahm keinen Einfluss auf die mAChR3 mRNA-Level in der Haut. In der AID zeigte sich eine tendenzielle eine Herunterregulation im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0556$). Tiere, die der Stress+AID Gruppe angehörten, zeigten eine gesteigerte Genexpression im Vergleich zur AID-Gruppe ($p=0,0159$). Durch das Blocken von NGF wurde dieser Effekt aufgehoben und auf AID Niveau herunterreguliert ($p=0,0079$). Der BDNF-Block zeigte keinen Einfluss im Vergleich zu Stress+AID Tieren (Abbildung 8 B).

3.2.3 Endogener nAChR α 7-Ligand SLURP1

In der Haut gestresster Tiere kam es zu einer gesteigerten Genexpression von SLURP1 ($p=0,0079$). In AID-Tieren zeigte sich ein abfallender Trend der SLURP1 mRNA-Level im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0556$). Zusätzlicher Stress hatte keinen Einfluss auf die in AID-Tieren gemessene Genexpression für SLURP1. Die Applikation des NGF AK resultierte in einer Hochregulation der SLURP1 Expression im Vergleich zu Stress+AID auf Niveau der Kontrollgruppe ($p=0,0159$). Das Blocken von BDNF führte zu keiner Veränderung der SLURP1 Expression verglichen mit der Stress+AID-Gruppe (Abbildung 9).

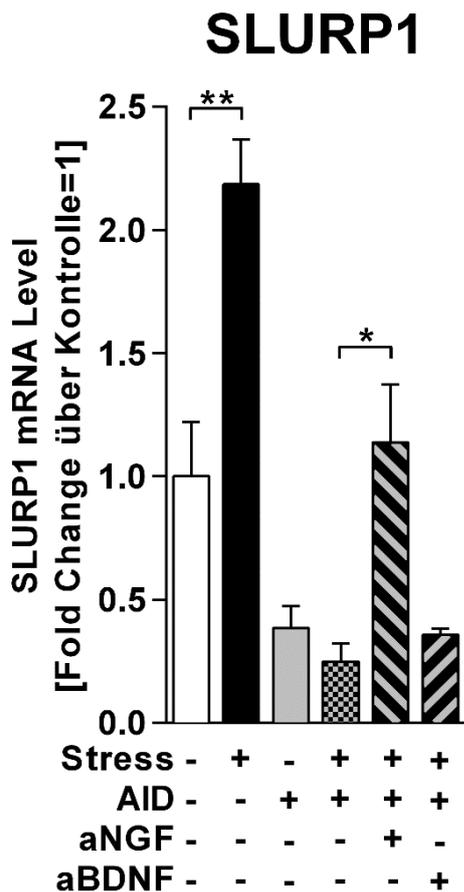


Abbildung 9 qPCR Analyse der SLURP1 Expression in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression des endogenen nAChR α 7-Liganden SLURP1 in der Haut analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

3.3 Stress steigert die Acetylcholin- und Cholin-Konzentration in der AID

Nach dem Nachweis der ChAT auf molekular Ebene in muriner Vollhaut und deren veränderter Expression unter Stress und in der AID wurde die Konzentration von ACh und dessen Bestandteil Cholin mittels HPLC in der Haut bestimmt (siehe 2.2.7). Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass sich die ACh-Konzentration der Haut unter Stress und in der AID nicht signifikant verändert. Die Kombination aus AID und Stress führte zu einer signifikanten Steigerung der ACh-Konzentration im Vergleich zu Tieren der AID-Gruppe ($p=0,0159$). Interessanterweise wurde dieser Effekt durch die Gabe spezifischer NT AK im Vergleich zur Stress+AID-Gruppe aufgehoben. Die ACh-Konzentration sank auf das Niveau der AID-Gruppe. Während der Block von NGF nur einen sinkenden Trend

Ergebnisse

zeigte ($p=0,0556$), konnte für den Block von BDNF ein hochsignifikanter Abfall der ACh-Konzentration nachgewiesen werden ($p=0,0079$) (Abbildung 10 A). Für Cholin wurden höhere Konzentrationen bestimmt, diese folgten jedoch dem Muster der gemessenen ACh-Konzentration (Abbildung 10 B).

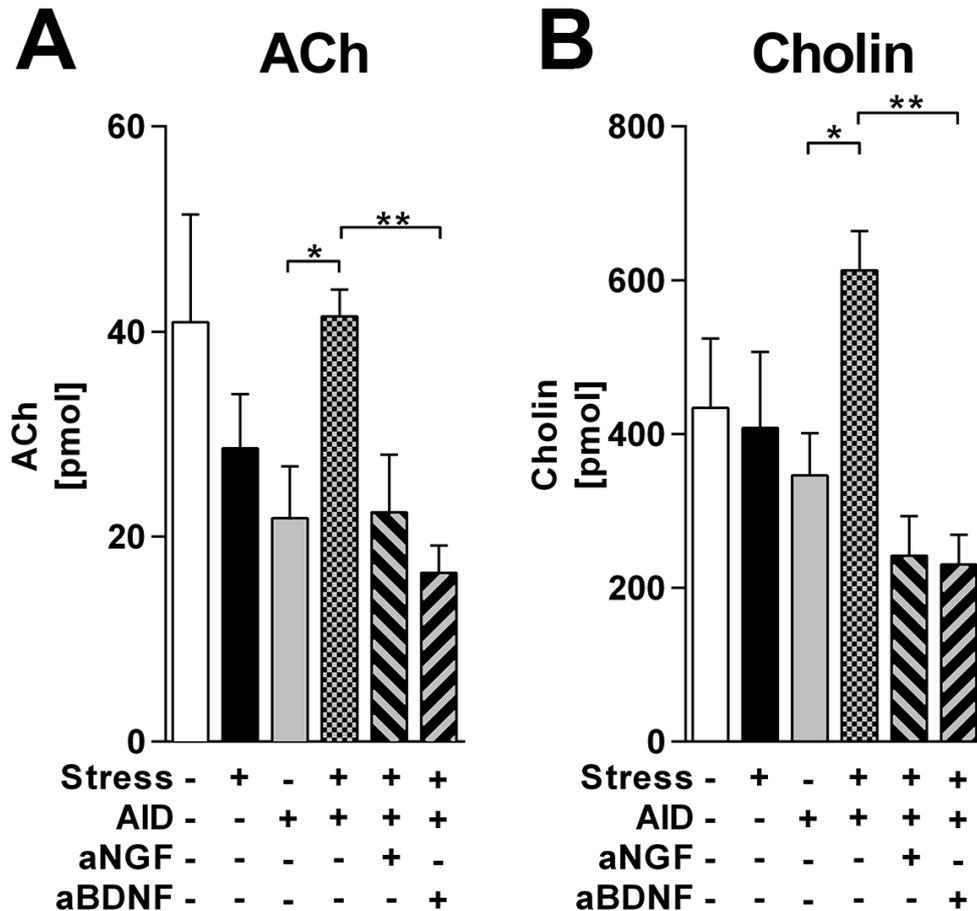


Abbildung 10 Bestimmung der ACh- und Cholin-Konzentration in muriner Vollhaut mittels HPLC

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels HPLC (siehe 2.2.7) die Konzentration von ACh und Cholin in der Haut bestimmt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. $*=p\leq 0,05$; $**=p\leq 0,01$.

3.4 Veränderte Expression TH1- und TH2-spezifischer Zytokine und assoziierter Rezeptoren unter Stress und AID

Die schematische Darstellung der Microarray-Analyse zeigte, dass die Expression TH1- und TH2-spezifischer Zytokine durch das NNCS reguliert werden könnte. Um weitere Einblicke in mögliche regulatorische Zusammenhänge zwischen dem NNCS der Haut und den Zytokinen zu erhalten, wurde die Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine in Biopsien des AID-Stress-Modells mittels qPCR analysiert.

Hierbei zeigte sich, dass die Genexpression von TNF α in muriner Vollhaut nicht durch Stress oder AID beeinflusst wird. Zusätzlicher Stress führte bei Tieren der AID-Gruppe zu einer Herunterregulation von TNF α im Vergleich zu ungestresster AID-Haut ($p=0,0079$). Das Blocken von NGF und BDNF hatte keinen Einfluss auf die bereits herabgesetzte TNF α Expression der Stress+AID-Gruppe (Abbildung 11 A).

Die Expression von IL-1 β wurde nicht in der Stress- oder AID-Gruppe beeinflusst. Erst die Kombination aus Stress und AID führte, vergleichbar mit der Beobachtung bei TNF α , zu einer Reduktion der IL-1 β Expression im Vergleich zu AID allein ($p=0,0079$). Das zusätzliche Blocken von NGF ($p=0,0079$) und BDNF ($p=0,0079$) resultierte in einer signifikanten Hochregulation von IL-1 β (Abbildung 11 B).

Für das TH2-Zytokin IL-10 konnte ein abfallender Trend des mRNA-Levels unter Stress im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden ($p=0,0952$). In der AID-Gruppe kam es hingegen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner Veränderung der IL-10 Expression. Zusätzlicher Stress in der AID-Gruppe führte zu einem signifikanten Abfall des mRNA-Levels im Vergleich zur AID allein ($p=0,0079$). Verglichen mit den Proben der Stress+AID-Gruppe hatte der zusätzliche Block von NGF und BDNF keinen Einfluss (Abbildung 11 C).

In der qPCR konnte kein Effekt von Stress oder AID im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe auf die Expression von TGF- β festgestellt werden. Die Kombination von Stress und AID hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der TGF- β mRNA-Level im Vergleich zur AID-Gruppe ($p=0,0286$). Das Blocken von NGF oder BDNF hatte keinen Einfluss auf die TGF- β Expression im Vergleich zu Tieren der Stress+AID-Gruppe (Abbildung 11 D).

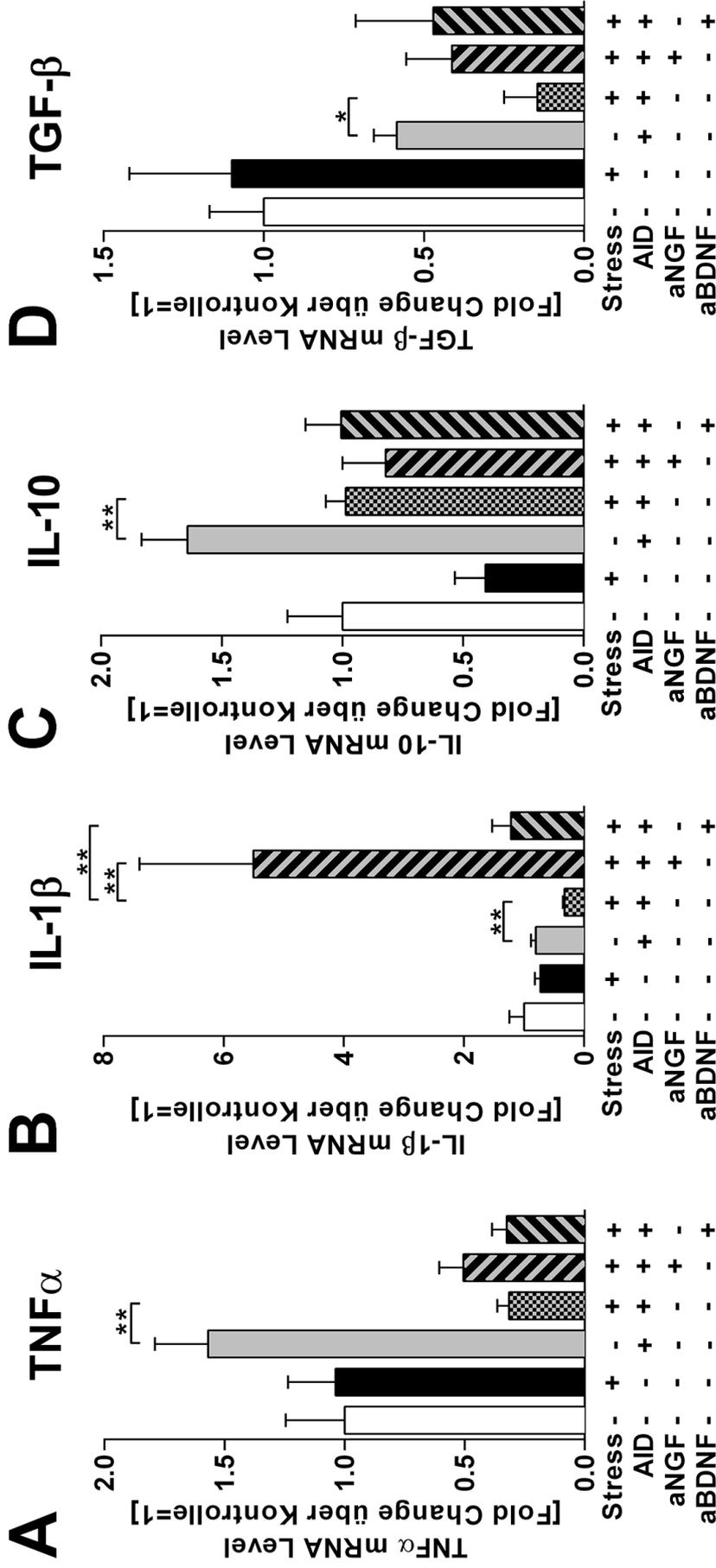


Abbildung 11 qPCR Analyse der Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression TH1- und TH2-spezifischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF- β analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

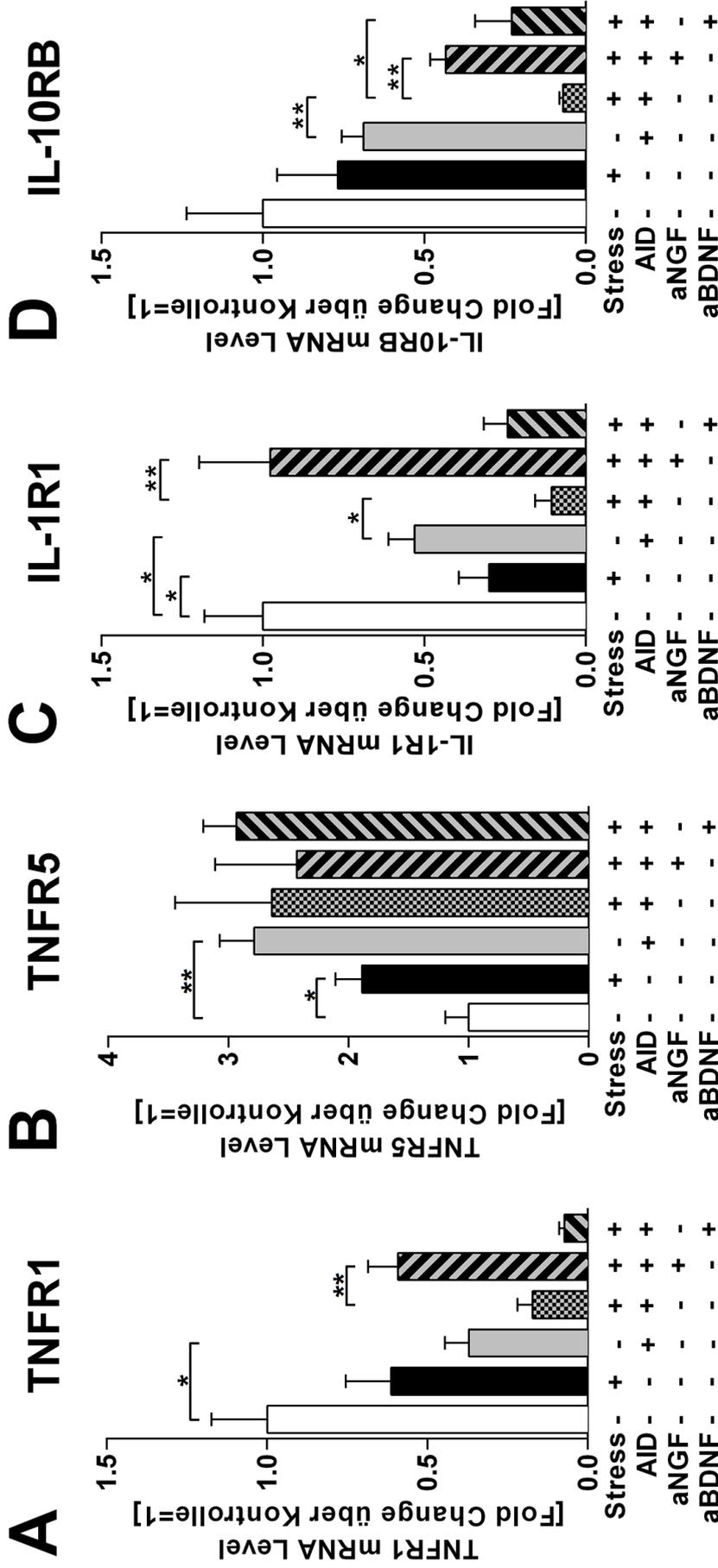


Abbildung 12 qPCR Analyse der Expression NNCS-assoziiierter Zytokinrezeptoren in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression der Zytokinrezeptoren TNFR1, TNFR5, IL-1R1 und IL-10RB analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

Ergebnisse

Die qPCR Analyse der NNCS-assoziierten Rezeptoren bestätigte tendenziell die für TNFR1 und TNFR5 im Microarray festgestellten Expressionsveränderungen unter Stress (Tabelle 19). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten lärmgestresste Tiere keine veränderte Expression von TNFR1 in der Haut. In der AID-Gruppe kam es zu reduzierten mRNA-Leveln ($p=0,0159$). Die Kombination von Stress und AID zeigte einen verstärkenden Trend auf diesen Effekt im Vergleich zur AID ($p=0,0952$). Bei zusätzlicher Applikation von aNGF in gestresster AID-Haut wurde die Herunterregulation im Vergleich zur Stress+AID Gruppe aufgehoben ($p=0,0079$). Die Gabe von aBDNF zeigte keinen Effekt (Abbildung 12 A).

Die Analyse von TNFR5 ergab eine Hochregulation in gestresster ($p=0,0317$) oder entzündeter ($p=0,0079$) Haut gegenüber der Haut der Kontrollgruppe. Die Kombination aus Stress und AID führte zu keiner Steigerung gegenüber der AID-Gruppe. Die zusätzliche Blockade von NGF und BDNF in Stress+AID Tieren hatte keinen Einfluss auf die Expression von TNFR5 (Abbildung 12 B)

Für den IL-1 Rezeptor IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) zeigte sich in der Haut gestresster Tiere ($p=0,0159$) oder in AID-Tieren ($p=0,0317$) ein vermindertes mRNA-Level im Vergleich mit Tieren der Kontrollgruppe. Die Kombination aus Stress und AID verstärkte die Herunterregulation von IL-1R1 signifikant im Vergleich zur AID allein ($p=0,0159$). Dieser Effekt wurde vollständig durch den Block von NGF aufgehoben und führte zu einem Anstieg des IL-1R1 mRNA-Levels im Vergleich zur Stress+AID-Gruppe auf Niveau der Kontrollgruppe ($p=0,0079$). Der BDNF-Block zeigte keinen Effekt (Abbildung 12 C).

Für den IL-10 Rezeptor Beta (IL-10RB) konnte keine durch Stress oder AID bedingte Regulation auf molekularer Ebene nachgewiesen werden. Der zusätzliche Stress auf Tiere der AID-Gruppe hingegen resultierte in einer hochsignifikanten Herunterregulation von IL-10RB ($p=0,0079$). Die Blockade der NT NGF ($p=0,0079$) und BDNF ($p=0,0317$) durch Gabe spezifischer AK hob den unter Stress+AID detektierten Effekt auf (Abbildung 12 D)

3.5 Mastzellen sind Teil des kutanen non-neuronalen cholinergen Systems

Auf molekularer Ebene konnte für das NNCS muriner Vollhaut eine stress- und entzündungsabhängige Regulation nachgewiesen werden. Der Nachweis der Genexpression in Vollhaut lieferte jedoch keinen Hinweis auf die spezifische Lokalisation der untersuchten Gene. Im Folgenden wurde die Lokalisation NNCS-relevanter Gene in der Haut mit Hilfe der IF angestrebt. Der Fokus lag dabei auf cholinergen Schlüsselspielern in kutanen MZ, da diese durch Interaktion mit NF und anderen Zellen des Immunsystems entscheidend zur Steuerung der Stressantwort der Haut beitragen.

Der immunhistochemische Nachweis NNCS-relevanter Proteine, insbesondere der AChR, wurde bereits in der Literatur als stark fehlerbehaftet beschrieben [282, 283]. Diese Erkenntnisse konnten vorwiegend durch den Einsatz spezifischer KO-Tiere erlangt werden. Die in dieser Arbeit genutzten AK wurden an ChAT-eGFP, $\alpha 7$ -KO und m3-KO Tieren getestet. Die AK gegen VACHT und SLURP1 wurden von anderen Arbeitsgruppen bezogen und dort bereits etabliert [267].

Von den vier getesteten AK gegen die ChAT zeigte nur ein AK (2080-0000, AbD Serotec) ein mit den Ergebnissen der ChAT-eGFP Tiere vergleichbares Färbemuster in muriner Vollhaut. Zusätzlich wurden fünf unterschiedliche, in der Literatur bisher nicht überprüfte nAChR $\alpha 7$ und mAChR3 AK in Gewebe spezifischer KO-Tiere mit unterschiedlichen Methoden auf deren Spezifität getestet. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass keiner der untersuchten nAChR $\alpha 7$ und mAChR3 AK eine spezifische Färbung zeigt [263]. Lediglich ein nAChR $\alpha 7$ AK (ab110851, Abcam) zeigte keine Färbung in der Haut von $\alpha 7$ -KO Tieren und wurde deshalb in den folgenden Analysen verwendet (Abbildung 13).

Ergebnisse

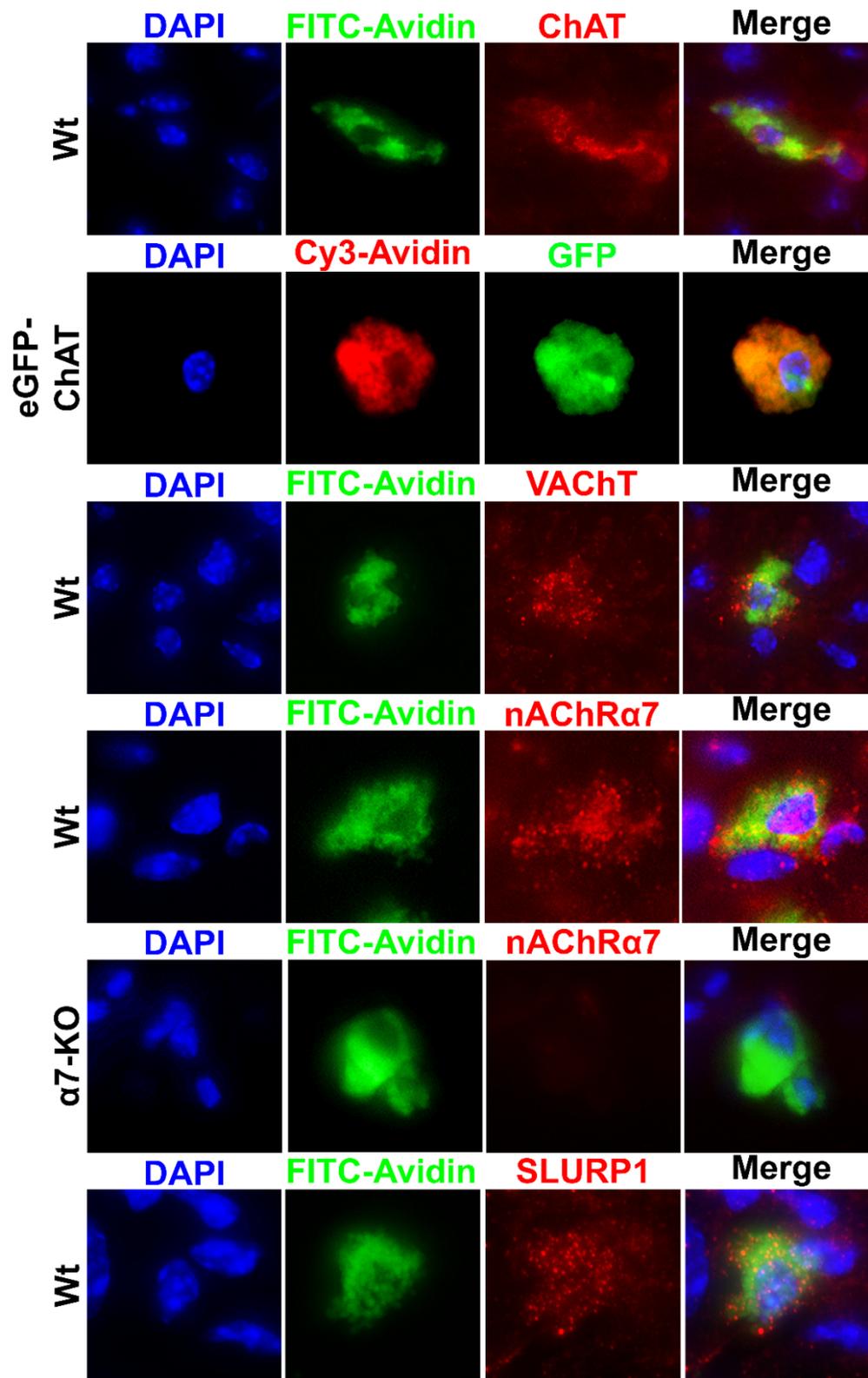


Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis der NNCS-Proteine in Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde die Expression NNCS-relevanter Schlüsselspieler in kutanen Mastzellen mittels Immunfluoreszenz (siehe 2.2.12.2) überprüft und dokumentiert. Hierbei wurden Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet.

Mit der IF konnten wichtige NNCS-relevante Proteine in kutanen MZ nachgewiesen werden (Abbildung 13). Die Expression der ChAT in kutanen MZ wurde im ChAT-eGFP Tier verifiziert. Auch der ACh-Transporter VAChT wurde in MZ detektiert. Der o.g. nAChR α 7 AK wies nAChR α 7 in MZ nach, zeigte zusätzlich keine Färbung in der Haut und in MZ von α 7-KO Tieren. Außerdem konnte der endogene nAChR α 7 Ligand SLURP1 in kutanen MZ nachgewiesen werden.

3.6 Stress und AID beeinflussen die ChAT-Expression in kutanen Mastzellen

Die qPCR Analyse muriner Vollhaut wies eine veränderte Expression der ChAT im AID-Stress-Modell nach, gleichzeitig zeigte auch die HPLC eine veränderte ACh-Konzentration in der Haut. Mittels IF konnte bereits die Existenz der ChAT in MZ nachgewiesen werden. Analysen der ChAT-Expression in kutanen MZ in Hautbiopsien des AID-Stress-Modells ergaben, dass Stress allein keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil ChAT positiver (ChAT+) MZ hat. In der AID nimmt die Anzahl ChAT+ MZ verglichen mit der Kontrollgruppe ab ($p=0,0159$). Bei zusätzlichem Stress erhöhte sich der Anteil der ChAT+ MZ im Vergleich zur AID-Haut ($p=0,0317$). Die Gabe von aNGF zeigte keinen Effekt, der Block von BDNF steigerte die Anzahl ChAT+ MZ im Vergleich zu Stress+AID-Gruppe ($p=0,0357$) (Abbildung 14 A).

Detailliertere Analysen der Expression zeigten ein komplexeres Färbemuster in ChAT+ MZ. Die MZ konnten in stark ($>50\%$ der MZ-Oberfläche ChAT+) und schwach ($\leq 50\%$ der MZ-Oberfläche ChAT+) unterteilt werden (Abbildung 14 C). Hieraus ergab sich, dass der prozentuale Anteil ChAT+ MZ in der Kontrollgruppe ausgeglichen war. Die Haut gestresster Mäuse ($p=0,0159$) oder in Tieren der AID-Gruppe ($p=0,0159$) zeigte eine Erhöhung der stark ChAT+ MZ. Parallel dazu kam es zu einer Abnahme der schwach ChAT+ MZ in der Stress- oder AID-Gruppe (je $p=0,0159$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlicher Stress milderte den gesehen Effekt ab und reduzierte die Anzahl stark ChAT+ MZ im Vergleich zur AID ($p=0,0079$). Der Anteil an schwach positiven MZ hingegen stieg signifikant an ($p=0,0079$). Das Blocken der NT hatte keinen Einfluss auf das Färbemuster der MZ (Abbildung 14 B).

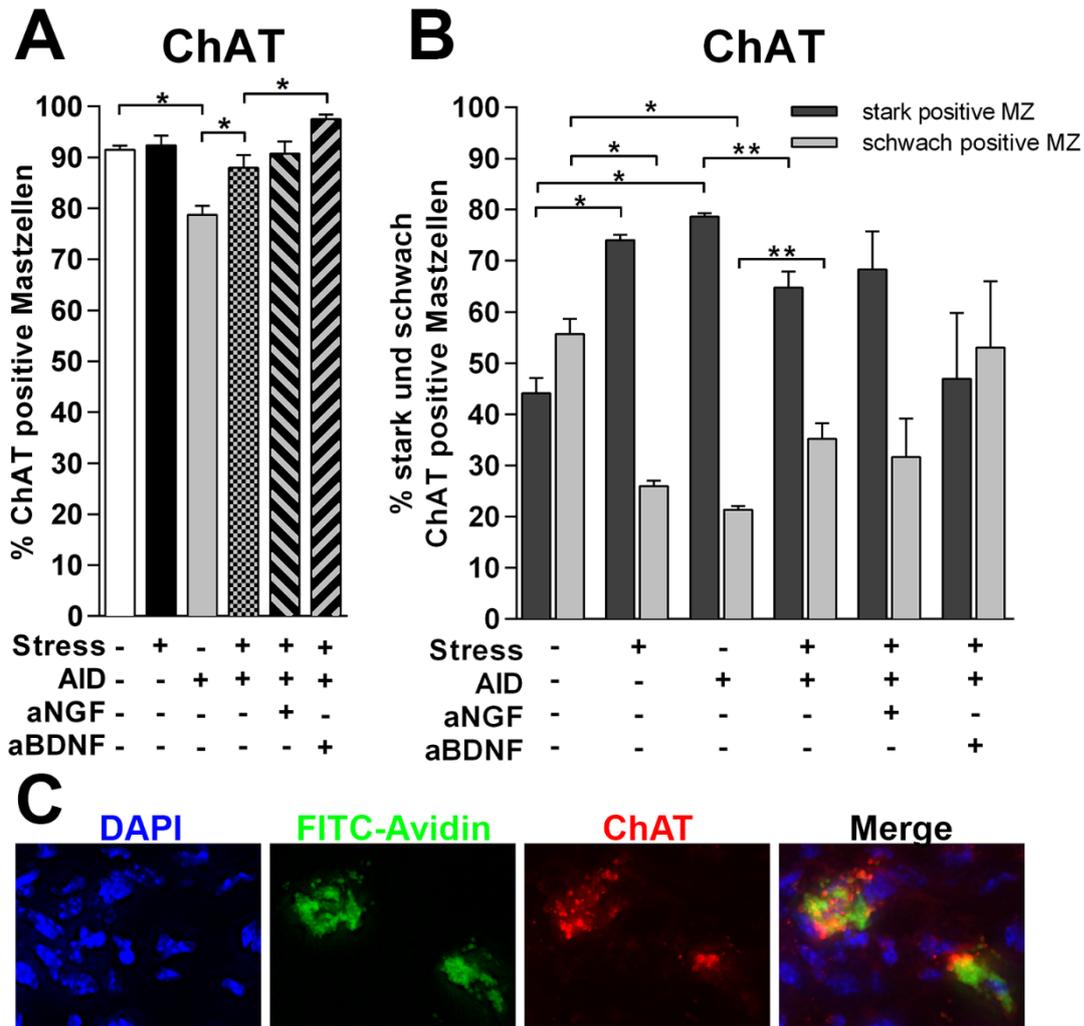


Abbildung 14 Histochemische Analyse der ChAT-Expression in kutanen Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels IF (siehe 2.2.12.2) die ChAT-Expression in kutanen MZ untersucht. Hierzu wurden je Tier zehn Gesichtsfelder in einer 400-fachen Vergrößerung der relevanten Region untersucht und die Mastzellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil ChAT+ Mastzellen wurde mit Hilfe der Gesamtzahl aller Mastzellen des jeweiligen Gesichtsfeldes errechnet. Hierbei wurden je Gruppe mindestens Hautbiopsien von vier unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

3.7 Stress steigert die Expression des nAChR α 7 in Mastzellen

Neben der Analyse der ChAT-Expression in kutanen MZ wurde die Expression des in die Zytokinexpression involvierten nAChR α 7 in MZ untersucht (Abbildung 15). Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der nAChR α 7+ MZ unter Stress in der Haut zunimmt ($p=0,0159$). In der Haut der AID-Tiere kam es zu einem signifikanten Abfall der nAChR α 7+ MZ im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0159$). Die Kombination aus Stress und AID hob die unter der AID beobachtete Abnahme der nAChR α 7+ MZ auf und führte

zu einem mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Anteil positiver MZ ($p=0,0159$). Die Blockade von NGF oder BDNF in Tieren der Stress+AID-Gruppe hob die stressbedingte Erhöhung des Anteils nAChR α 7+ MZ wieder auf ($p=0,0357$).

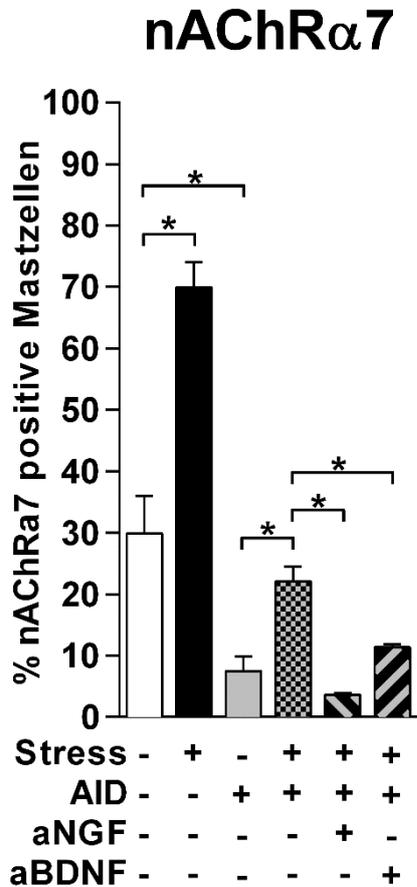


Abbildung 15 Histochemische Analyse der nAChR α 7-Expression in kutanen Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels IF (siehe 2.2.12.2) die nAChR α 7-Expression in kutanen MZ untersucht. Hierzu wurden je Tier zehn Gesichtsfelder in einer 400-fachen Vergrößerung der relevanten Region untersucht und die Mastzellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil ChAT+ Mastzellen wurde mit Hilfe der Gesamtzahl aller Mastzellen des jeweiligen Gesichtsfeldes errechnet. Hierbei wurden je Gruppe mindestens Hautbiopsien von vier unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p\leq 0,05$; **= $p\leq 0,01$.

3.8 Veränderte Expression TH1- und TH2-spezifischer Zytokine in kutanen Mastzellen

In der IF konnten die TH1- und TH2-spezifischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10 und IL-1 β in kutanen MZ nachgewiesen werden (Abbildung 16)

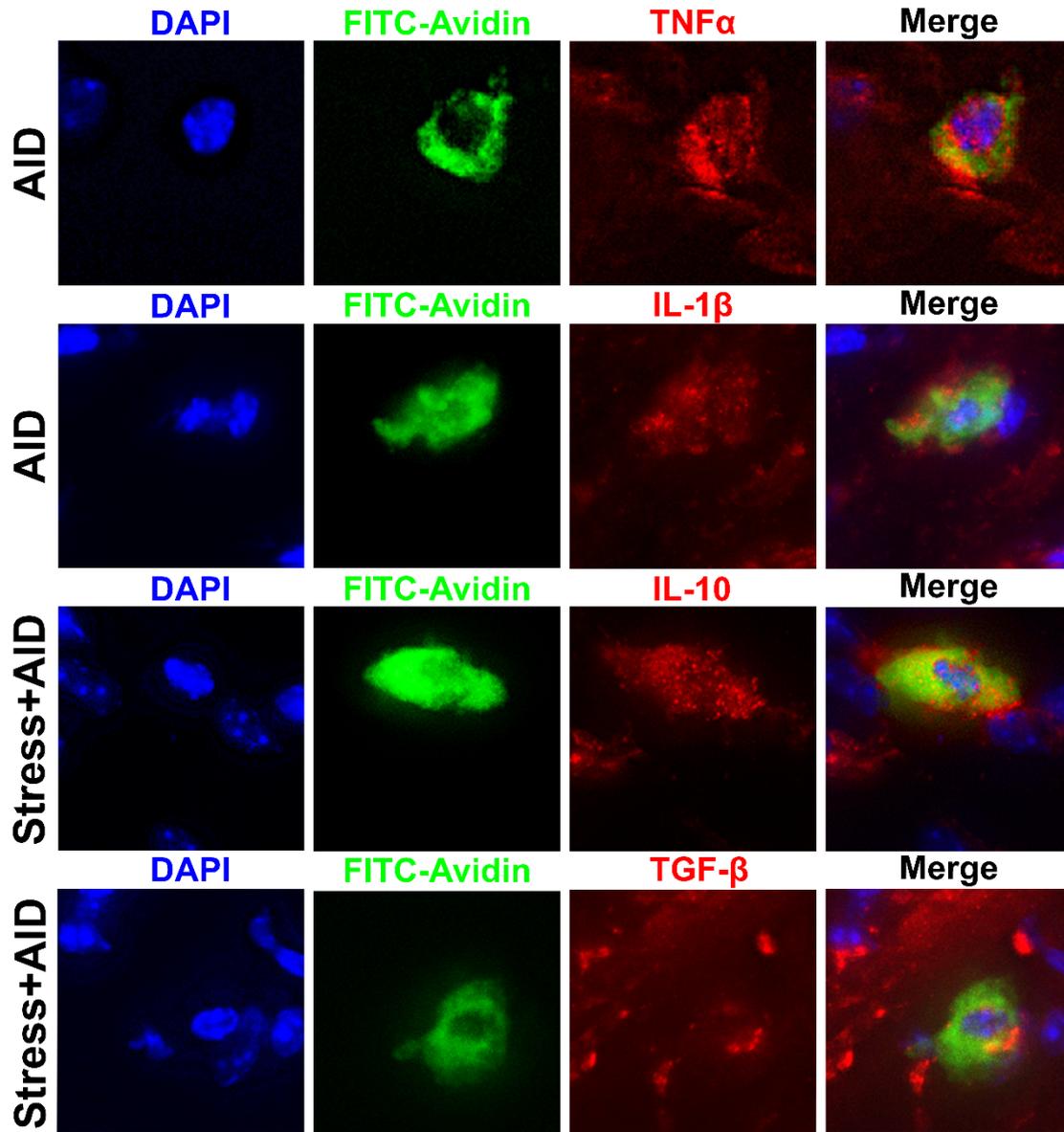


Abbildung 16 Histochemischer Nachweis der TH1- und TH2-Zytokine in Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde die Expression der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF- β in kutanen Mastzellen mittels Immunfluoreszenz (siehe 2.2.12.2) überprüft und dokumentiert. Hierbei wurden Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet.

Ergebnisse

In der genaueren Analyse zeigte sich, dass Stress den prozentualen Anteil TNF α + MZ in der Haut nicht verändert. In entzündeter AID-Haut kam es zu einer deutlichen Zunahme TNF α + MZ im Vergleich zur Haut der Kontrollgruppe ($p=0,0079$). In der Haut von AID-Tieren, die zusätzlichem Stress ausgesetzt waren, kam es im Vergleich zur AID-Gruppe zu einer Abnahme der TNF α + MZ ($p=0,0159$). Verglichen mit der Stress+AID-Gruppe reduzierte die Behandlung mit spezifischen NGF ($p=0,0317$) und BDNF ($p=0,0317$) AK den Anteil der TNF α + MZ auf Niveau der Kontrollgruppe (Abbildung 17 A).

Im Gegensatz zu TNF α + MZ steigerte Lärmstress den Anteil IL-1 β + MZ in der Haut ($p=0,0159$). In der AID erhöhte sich der Anteil positiver MZ im Vergleich zur Kontrollgruppe und nahezu alle kutanen MZ zeigten eine IL-1 β Expression ($p=0,0159$). Verglichen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe zeigte sich in der AID-Gruppe der größte Anteil IL-1 β + MZ ($p=0,0286$). Wie bei TNF α führte zusätzlicher Stress in der AID zu einer Abnahme der IL-1 β + MZ in der Haut im Vergleich zur AID allein ($p=0,0159$). Die Applikation der NT AK zeigte im Vergleich zur Stress+AID-Gruppe keinen Effekt (Abbildung 17 B).

Für die beiden TH2-spezifischen Zytokine IL-10 und TGF- β konnte kein Einfluss auf deren Expression kutanen MZ unter Stress festgestellt werden. Sowohl IL-10+ MZ ($p=0,0317$) als auch TGF- β + MZ ($p=0,0159$) zeigten eine signifikante Abnahme in der Haut der AID-Gruppe. Die in der AID beobachtete Abnahme von IL-10+ und TGF- β + MZ hob sich bei zusätzlichem Stress innerhalb der AID-Gruppe auf und es kam zu einer Zunahme der IL-10+ ($p=0,0079$) und TGF- β + MZ ($p=0,0079$) im Vergleich zur AID allein. Für die Expression von IL-10 in MZ konnte ein Abfall beobachtet werden, wenn die Tiere einen AK gegen BDNF erhielten ($p=0,0159$), der Block von NGF zeigte keinen Einfluss verglichen mit der Stress+AID-Gruppe. Interessanterweise zeigte die Behandlung mit einem AK gegen BDNF keinen Einfluss auf die TGF- β + MZ, jedoch nahm deren prozentualer Anteil unter einer Behandlung mit einem NGF AK ab ($p=0,0317$) (Abbildung 17 C & D).

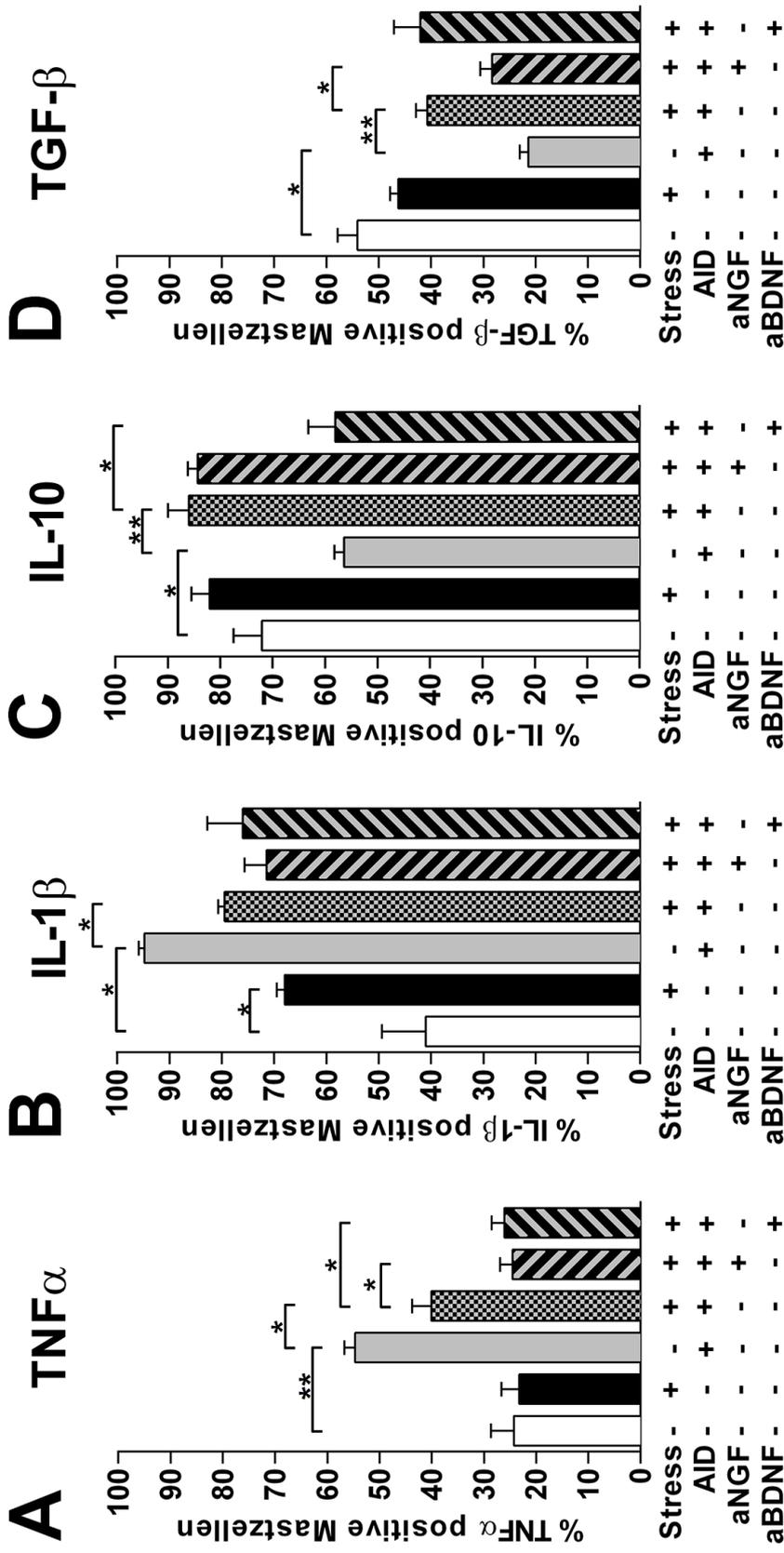


Abbildung 17 Histochemische Analyse der Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine in Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels IF (siehe 2.2.12.2) die Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF- β in Mastzellen analysiert. Hierzu wurden je Tier zehn Gesichtsfelder in einer 400-fachen Vergrößerung der relevanten Region untersucht und die Mastzellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil positiver Mastzellen wurde mit Hilfe der Gesamtzahl aller Mastzellen des jeweiligen Gesichtsfeldes errechnet. Hierbei wurden je Gruppe mindestens Hautbiopsien von vier unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

3.9 Mastzellproteasen

3.9.1 Gesteigerte Expression der Mastzellprotease 4 in der AID

MZP gehören zu den am stärksten durch MZ exprimierten Proteinen. Aufgrund ihres Einflusses auf Stressmediatoren, die unter anderem entscheidend an der neurogenen Entzündung beteiligt sind, sollte mit den folgenden Untersuchungen die Expression der MZP4 und MZP6 in muriner Haut bestimmt werden.

Hierbei wurde für die Analyse der MZP im ersten Schritt die Proteinexpression und deren Lokalisation in der Haut mittels IF-Färbung von MZP4 und MZP6 in den im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien durchgeführt (Abbildung 18 & Abbildung 19).

Die Untersuchung der MZP4-Expression zeigte, dass Stress keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil MZP4+ MZ im Vergleich zur Kontrollgruppe besitzt. In AID-Haut hingegen kam es zu einem signifikanten Anstieg der MZP4+ MZ im Vergleich zur Kontrollhaut ($p=0,0079$). Zusätzlicher Stress verstärkte den Anstieg MZP4+ MZ im Vergleich zur AID ($p=0,0317$). Das Blocken von NGF reduzierte den Anteil der MZP4+ MZ im Vergleich zur Stress+AID-Gruppe ($p=0,0286$), der Block von BDNF zeigte keinen Einfluss auf die MZ (Abbildung 18 A).

Für eine detaillierte Analyse des Färbemusters wurden die MZ in stark positive ($>50\%$ der Zelloberfläche gefärbt), schwach positive ($\leq 50\%$ der Zelloberfläche gefärbt) und degranulierte (Färbung in unmittelbarer Nähe der Zelle) MZ unterteilt (Abbildung 18 B & C & Abbildung 19 B & C).

Der steigende Anteil an MZP4+ MZ in der AID wird von einer Abnahme stark MZP4+ ($p=0,0079$) und Zunahme der schwach MZP4+ ($p=0,0079$) MZ begleitet. Zusätzlich nimmt der Anteil der degranulierten MZ signifikant zu ($p=0,0079$). In Hautbiopsien der Stress+AID-Gruppe konnte im Vergleich zur AID allein keine Veränderung der schwach MZP4+ oder degranulierten MZ nachgewiesen werden, jedoch nahm der Anteil der stark MZP4+ MZ zu ($p=0,0159$). Die Behandlung mit spezifischen NGF oder BDNF AK konnte keinen Effekt auf den Anteil der schwach MZP4+ oder degranulierten MZ auslösen, jedoch kam es unter Behandlung mit aNGF zu einer Abnahme der stark MZP4+ MZ ($p=0,0286$) (Abbildung 18 B & C).

Die histochemische Untersuchung MZP6+ MZ ergab keinerlei Veränderung der MZP6-Expression in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen (Abbildung 19 A). Die detailliertere Betrachtung ergab ein ausgeglichenes Verhältnis stark und schwach MZP6+ MZ im Rahmen des AID-Stress-Modells (Abbildung 19 B & C). Degranulierte MZ konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19 B).

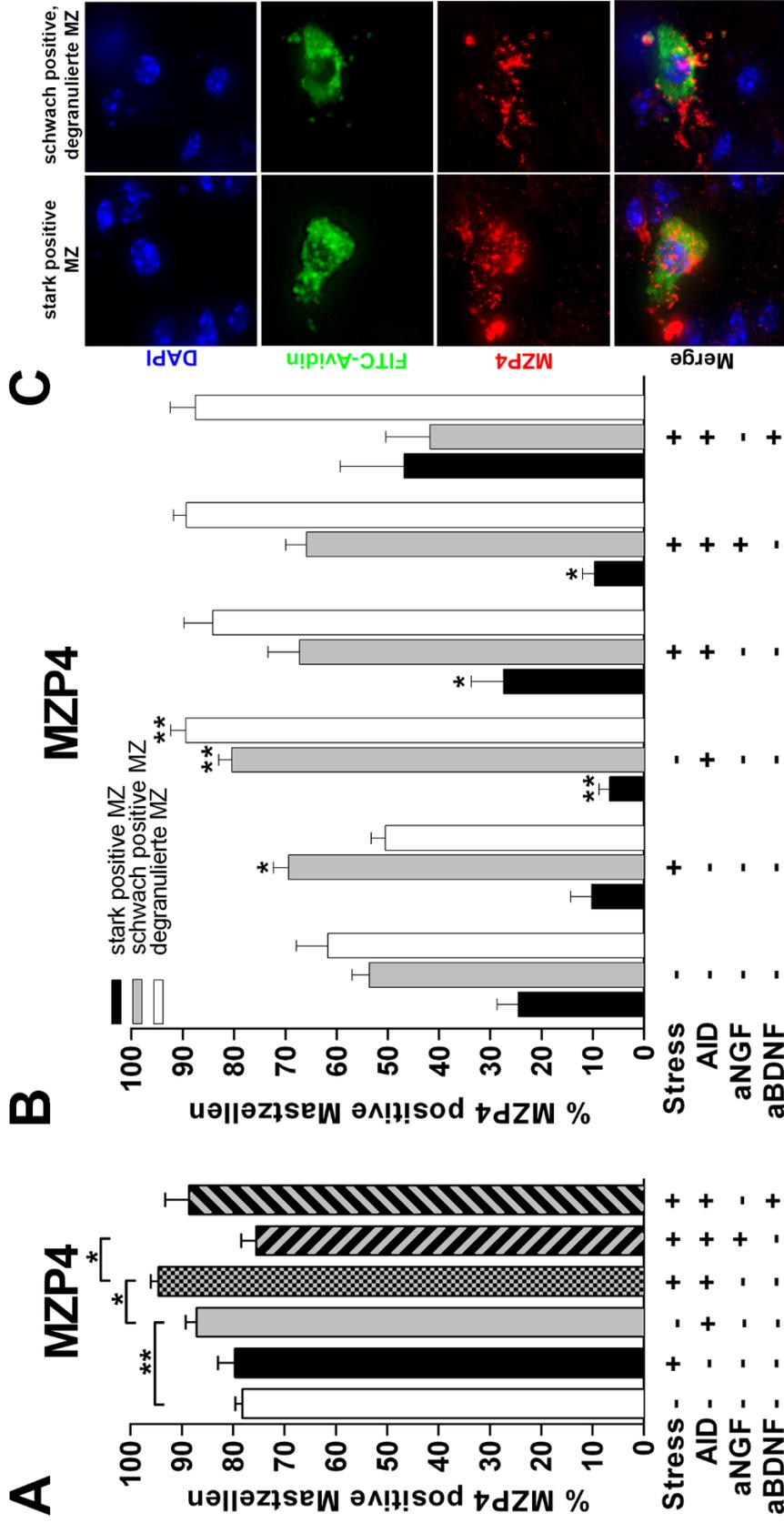


Abbildung 18 Histochemische Analyse der MZP4 Expression in kutanen Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels IF (siehe 2.2.12.2) die Expression der MZP4 in Mastzellen analysiert. Je Tier wurden zehn Gesichtsfelder in einer 400-fachen Vergrößerung der relevanten Region untersucht und die Mastzellen ausgezählt. Hierbei wurden je Gruppe mindestens die Hautbiopsien von vier unterschiedlichen Tieren verwendet. (A) Prozentualer Anteil MZP4+ Mastzellen. (B) Prozentuale Verteilung des MZP4 Färbemusters. Stark und schwach positive Mastzellen repräsentieren den jeweiligen Anteil der MZP4+ Mastzellen. Degranulierte Mastzellen sind nicht zwangsläufig MZP4+ und beziehen sich prozentual auf alle gezählten kutanen Mastzellen. (C) Exemplarische Bilder MZP4+ Mastzellen. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

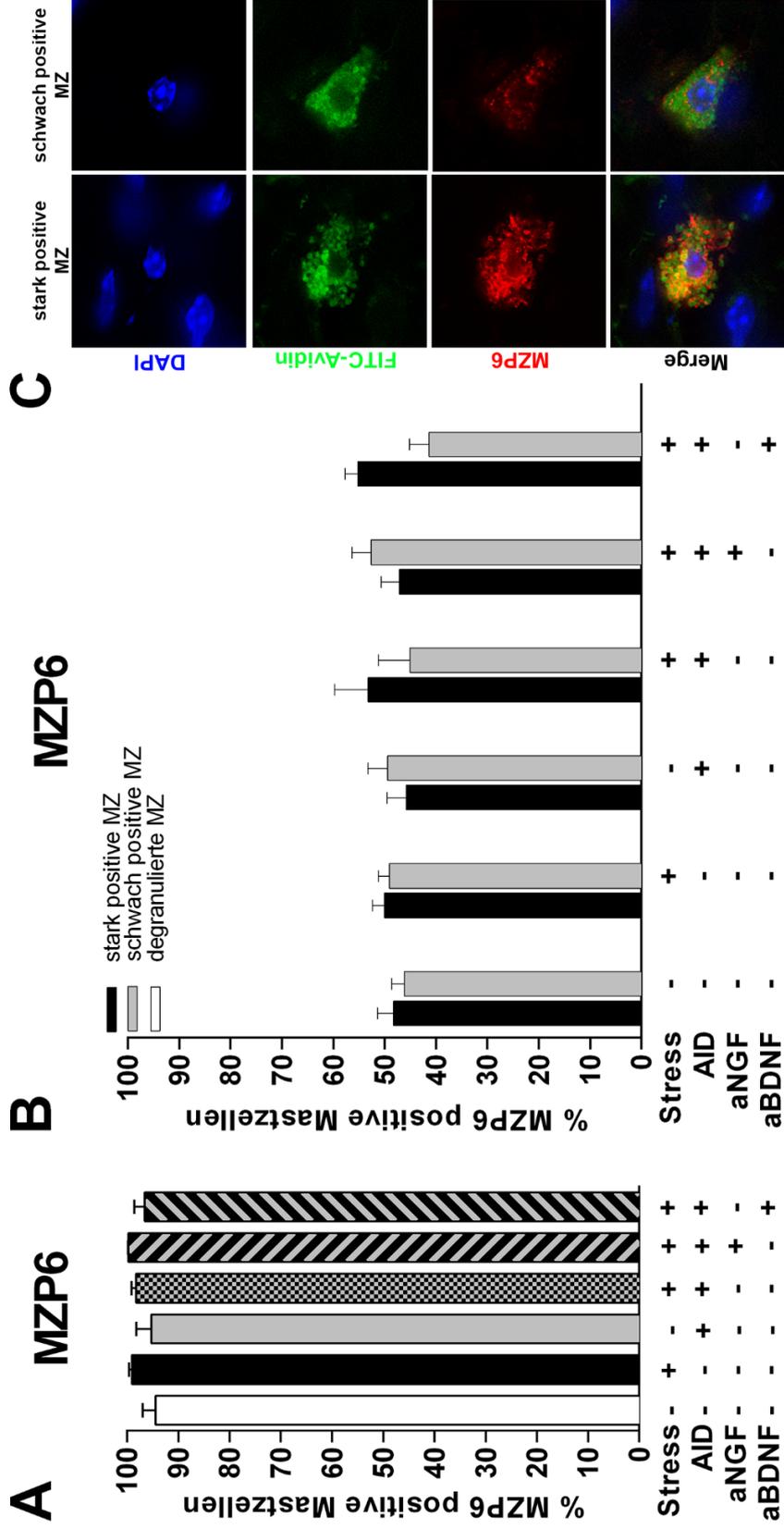


Abbildung 19 Histochemische Analyse der MZP6 Expression in kutanen Mastzellen

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.1 und 2.2.12.1 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels IF (siehe 2.2.12.2) die Expression der MZP6 in Mastzellen analysiert. Hierzu wurden je Tier zehn Gesichtsfelder in einer 400-fachen Vergrößerung der relevanten Region untersucht und die Mastzellen ausgezählt. Hierbei wurden je Gruppe mindestens die Hautbiopsien von vier unterschiedlichen Tieren verwendet. (A) Prozentualer Anteil MZP6+ Mastzellen. (B) Prozentuale Verteilung des MZP6 Färbemusters. Stark und schwach positive Mastzellen repräsentieren den jeweiligen Anteil der MZP6+ Mastzellen. Degranulierte Mastzellen sind nicht zwangsläufig MZP6+ und beziehen sich prozentual auf alle gezählten kutanen Mastzellen. (C) Exemplarische Bilder MZP6+ Mastzellen. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$

3.9.2 Der nAChR α 7 ist in die Expression der Mastzellprotease 4 involviert

Die histochemischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Blockade von NGF Einfluss auf die MZP-Expression in MZ besitzt. Da NGF den cholinergen Genlokus beeinflusst, sollte im nächsten Schritt eine mögliche Abhängigkeit der MZP-Expression vom NNCS, insbesondere von nAChR α 7, untersucht werden. Hierfür wurde die PMZK genutzt. Diese wurde wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden kultivierte MZ aus Wt und α 7-KO Tieren mit SP und mit SP+SLURP1 stimuliert und die Expression der MZP auf molekularer Ebene untersucht.

Hierbei zeigte sich in der qPCR-Analyse, dass nAChR α 7-defiziente MZ die MZP4 unter Kontrollbedingungen nicht verändert zu MZ der Wt Tiere exprimieren. Die Gabe von SLURP1 oder SP führt dabei zu keiner Veränderung in den Wt MZ. Die Behandlung der α 7-KO MZ mit SLURP1 zeigt keinen Einfluss, jedoch führt deren Behandlung mit SP zu einer tendenziellen Reduktion der MZP4-Expression. Behandelt man die MZ mit SLURP1 und SP kommt es zu einem nicht signifikanten, aber sichtbaren Anstieg der MZP4 mRNA-Level in MZ der Wt Tiere, die gleiche Behandlung führt im α 7-KO Tier zu einem signifikanten Abfall der MZP4-Expression ($p=0,0357$) (Abbildung 20 A).

Die Untersuchung der MZP6 mRNA-Level führte zu keinen signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Für die Behandlung mit SLURP1 und SP in Wt und α 7-KO Tieren zeigte sich ein ähnlicher visueller Trend, jedoch keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 20 B).

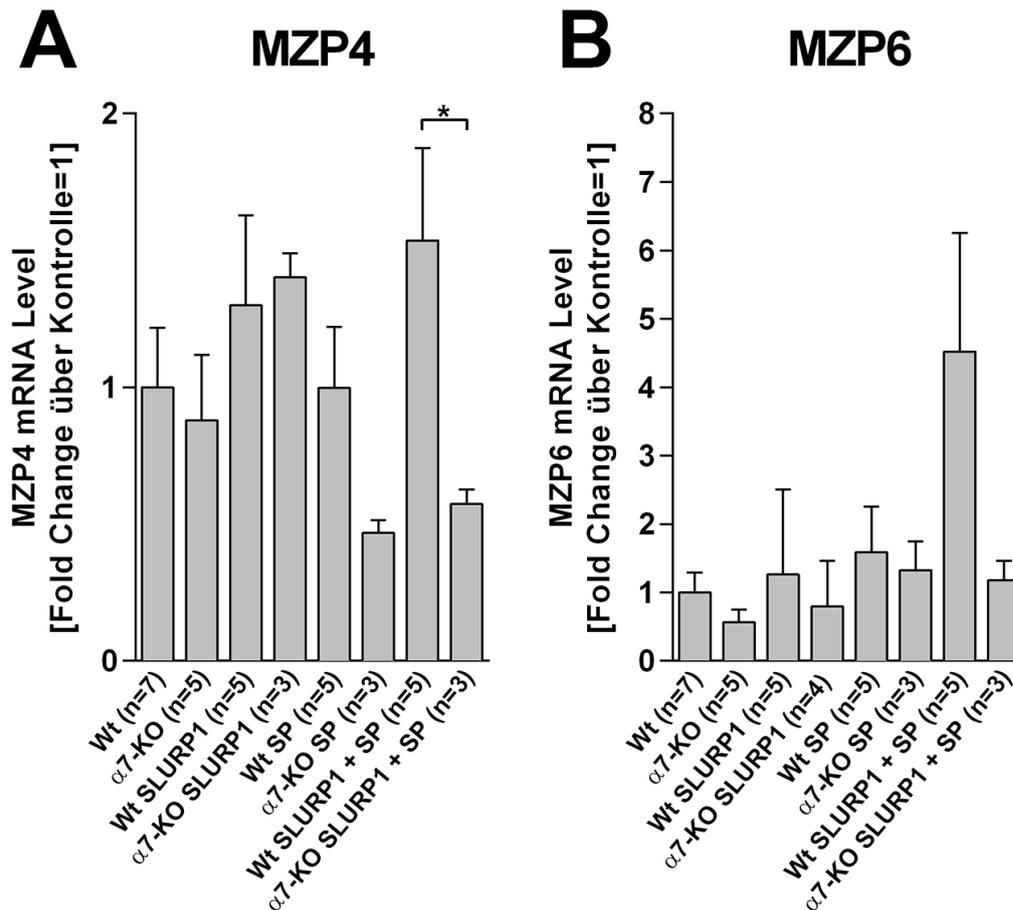


Abbildung 20 qPCR Analyse der MZP4- und MZP6-Expression in peritonealen Mastzellen

Die in der peritonealen Mastzellkultur gewonnenen Mastzellen wurden wie unter Kapitel 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression der MZP4 und MZP6 analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von mindestens drei unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

3.9.3 Stress reguliert die Mastzellprotease 4 in der AID herunter

MZP werden in der Haut ausschließlich durch MZ exprimiert. Die molekulare Analyse derer mRNA-Level in muriner Vollhaut im Rahmen des AID-Stress-Modells ist somit spezifisch für die Expression der MZ zu interpretieren. Bei dieser Analyse zeigte sich, dass Stress oder AID keinen Einfluss auf die Expression der MZP4 in der Haut nehmen. Die Kombination aus Stress und AID resultierte in herunterregulierten mRNA-Leveln der MZP4 im Vergleich zur AID allein ($p=0,0079$). Der Block von NGF hob diesen Effekt auf und resultierte in einer Hochregulation der MZP4 im Vergleich zur Stress+AID-Gruppe ($p=0,0079$). Der BDNF AK zeigte keinen Einfluss in der Stress+AID-Gruppe (Abbildung 21 A).

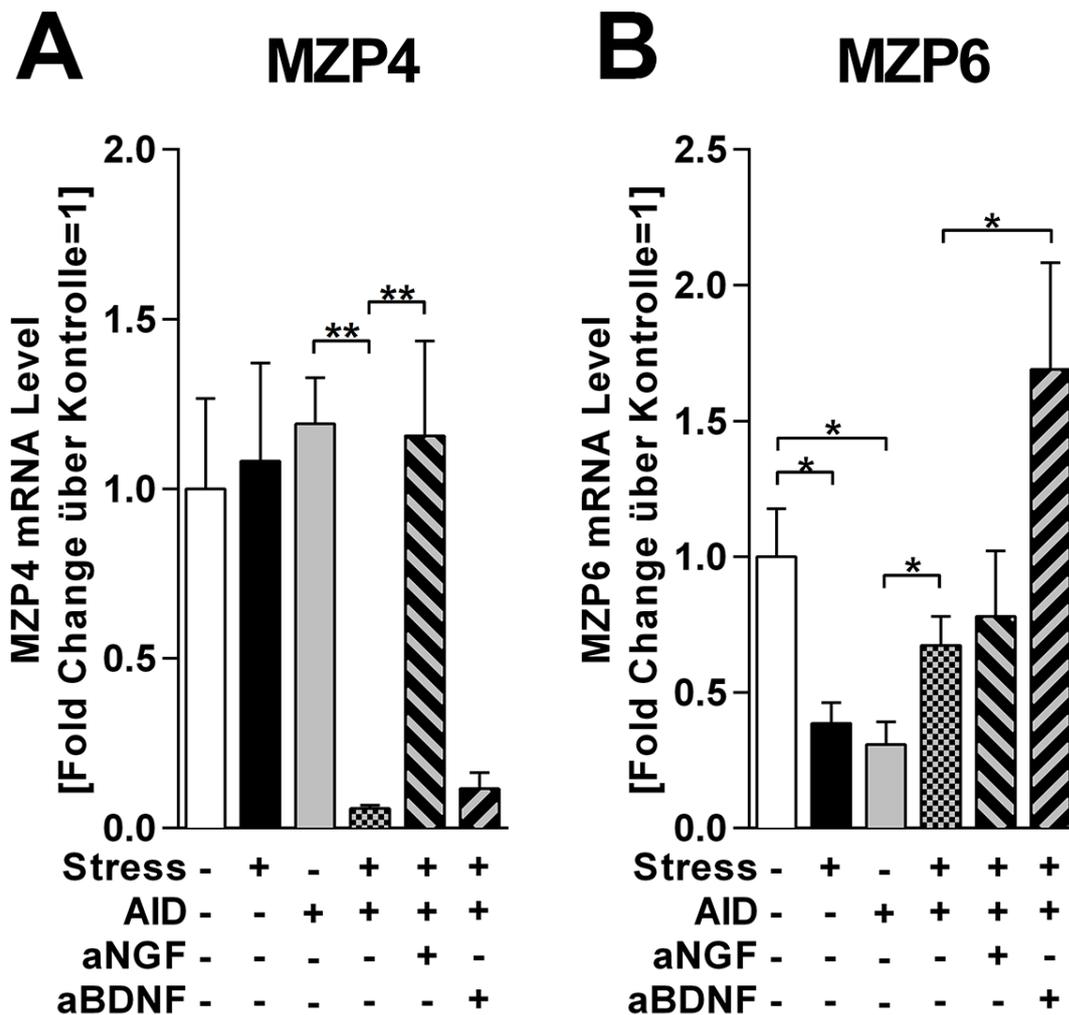


Abbildung 21 qPCR Analyse der Expression von MZP4 und MZP6 in muriner Vollhaut

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression der MZP4 und MZP6 analysiert. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$.

Die Analyse der MZP6 mRNA-Level ergab eine Herabregulation unter Stress ($p=0,0317$) und in der AID ($p=0,0317$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Haut von Tieren der Stress+AID-Gruppe kam es im Vergleich zur AID allein zu einer gesteigerten Genexpression der MZP6 ($p=0,0317$). Der zusätzliche Block von NGF in Tieren der Stress+AID-Gruppe zeigte keinen Effekt. Das Blocken von BDNF resultierte in einem deutlichen Anstieg der MZP6 mRNA-Level im Vergleich zu Tieren der Stress+AID-Gruppe ($p=0,0317$) (Abbildung 21 B).

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von Stress und Entzündung auf das kutane NNCS untersucht werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Stress und AID einen Einfluss auf NNCS-assoziierte Gene in muriner Haut besitzen. Darüber hinaus haben sie einen Einfluss auf die Genexpression NNCS-abhängiger pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren. Die *in vivo* Blockade der NT NGF und BDNF hebt die für Stress und die AID beobachteten Effekte teilweise auf und verdeutlicht deren Rolle in der Stress- und Entzündungsreaktion der Haut. Die detaillierte Analyse der kutanen MZ offenbart, dass MZ ein aktiver Bestandteil des kutanen NNCS sind. Zusätzlich verändert sich die Expression NNCS-assoziiierter Proteine und relevanter Zytokine durch Stress, Entzündung und den NT-Block auch auf Ebene der MZ. Auch die Expression der Stressmediator-verdauenden MZP, insbesondere MZP4, verändert sich unter Stress und Entzündung. Die SP-verdauende MZP4 nimmt möglicherweise eine initial protektive Rolle im Rahmen der Stressreaktion und neurogenen Entzündung ein. Speziell ihre Expression wird durch nAChR α 7 kontrolliert und stellt einen schützenden Mechanismus dar.

In der folgenden Diskussion wird auf jede Frage, die im Abschnitt „Zielsetzung der Arbeit“ gestellt wurde, ausführlich eingegangen und die jeweiligen Ergebnisse im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Forschung diskutiert.

4.1 Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziiierter Gene in der Haut: Microarray-Analyse

Die im ersten Schritt durchgeführte Microarray-Analyse, ermöglichte es erste Einblicke in die an der Stressreaktion der Haut involvierten Signalwege zu erhalten. Die genaue Analyse der Signalwege und Ergebnisse zeigte ein komplexes zusammenhängendes System, in dem das NNCS eine übergeordnete und regulierende Stellung einnimmt und Zytokine und deren Rezeptoren kontrolliert (Abbildung 6). Im Detail bedeutet dies, dass Stress die Expression der IL-1R-, TNFR1- und TNFR5-stimulierenden Zytokine beeinflusst. Gleichzeitig werden deren Signalwege oder deren Liganden übergeordnet durch ACh, nAChR oder mAChR, reguliert. Die Signalwege selbst übernehmen immunregulatorische Funktionen und ermöglichen dem NNCS einen indirekten Einfluss auf das Immunsystem. Durch den Microarray konnten erste Einblicke in die vielschichtige, möglicherweise stressbedingte Regulationen innerhalb des kutanen NNCS gewonnen werden.

Die Ausrichtung der Immunbalance in Richtung TH1 oder TH2 wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst und unterliegt einer komplexen Steuerung. TNFR1 und TNFR5 können jedoch als Indikatoren der aktuell vorherrschenden Ausrichtung verstanden werden. TNFR1 wird durch TNF α aktiviert und steuert die Aktivität des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B*. Für TNF α konnte bereits eine Regulation in Abhängigkeit von nAChR α 7 in verschiedenen TNF α sezernierenden Zellen nachgewiesen werden [280, 284]. Die TNFR1-Aktivierung geht mit einer erhöhten Produktion der TH1-spezifischen Zytokine TNF α und IL-1 β einher. Gleichzeitig nimmt nAChR α 7 Einfluss auf die Expression von IL-1 und beeinflusst über diesen Signalweg ebenso *nuclear factor kappa B*. Die unter Stress verminderte Expression von TNFR1 kann also als Verschiebung der Immunbalance zugunsten TH2 verstanden werden. Dem gegenüber steht der vorwiegend durch B-Zellen exprimierte TNFR5. Dieser wird durch von T-Zellen stammenden CD40L aktiviert, welches auch unter der Kontrolle mAChR und nAChR steht. Parallel dazu inhibiert TNFR5 die TH1-Immunantwort. Die unter Stress gesteigerte TNFR5-Expression kann als TH2-Shift verstanden werden und ist somit AD-förderlich.

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass die in der Microarray-Analyse festgestellte Verschiebung den aus der Literatur für chronischen Stress zu erwartenden Effekten entspricht [158, 285, 286]. Ein im AID-Stress-Modell angewandter Lärmstress mit einer Dauer von 24 Std. entspricht der Dauer eines subchronischen bis chronischen Stressors (Abbildung 4) [54]. Zusätzlich verdeutlicht die schematische Darstellung erstmals die übergeordnete Rolle des kutanen NNCS und dessen vielfältigen Einfluss auf das Immunsystem. Es könnte somit an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Erkrankungen mit ursächlicher oder einhergehender immunologischer Dysbalance beteiligt sein [166, 287].

4.2 Stress und AID beeinflussen die Regulation NNCS-assoziierter Gene in der Haut: qPCR

Nach diesen ersten Hinweisen auf die stressabhängige Regulation möglicher Zielstrukturen des NNCS folgte die Ausweitung der Untersuchungen auf alle Gruppen des AID-Stress-Modells auf molekularer Ebene in Vollhautbiopsien mittels qPCR. Hierbei lag der Fokus zunächst auf den übergeordnet agierenden Schlüsselspielern des NNCS.

Es ist bekannt, dass Stress allein eine erhöhte ACh-Sekretion einleiten kann, jedoch ergab die Analyse des ACh-Stoffwechsels der Haut im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen nachweisbaren durch Lärmstress ausgelösten Effekt [288]. Das entscheidende

Diskussion

Enzym der ACh-Synthese ChAT, der Transporter VAcHT und die ACh-abbauenden Enzyme blieben unter Stress unverändert. Peters et al. konnten zeigen, dass NGF, welches den cholinergen Genlokus von ChAT und VAcHT kontrolliert, in der Haut gestresster Mäuse nicht erhöht ist [12]. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den hier nicht stattfindenden Anstieg von ChAT und VAcHT darstellen. Auf Ebene der AChR kam es zu einer Steigerung der nAChR α 7-Expression, welche möglicherweise durch Inhibition von TNF α und IL-1 β unter Stress zum Drift in Richtung TH2-Immunität beiträgt. Der im weiteren Verlauf diskutierte mangelnde Anstieg von TNF α und IL-1 β unter Stress könnte hierfür ein Indiz sein (Tabelle 21). Der mAChR3 blieb in seiner Expression unverändert. Eine zusätzliche Steigerung der nAChR α 7-aktivierenden Liganden konnte nicht detektiert werden (Tabelle 20).

Zusammengefasst lassen diese für die Stress-Gruppe erhobenen Ergebnisse auf einen geringen stressbedingten Einfluss auf das NNCS schließen. Lediglich der nAChR α 7- und SLURP1-Anstieg könnte als TH2-förderlich interpretiert werden, da TNF α und IL-1 β hierrunter inhibiert werden könnten.

Tabelle 20 Übersicht der qPCR- und HPLC-Ergebnisse des kutanen NNCS

Pfeile stellen signifikante Expressionsveränderungen zur Vergleichsgruppe dar ($p \leq 0,05$); Pfeile in Klammern zeigen Trends ($0,05 > p \leq 0,10$).

Gen	Stress (vs. Kontrolle)	AID (vs. Kontrolle)	Stress+AID (vs. AID)
ChAT	→	↓	(↑)
VAcHT	→	→	↑
AChE	→	→	↑
BChE	→	↓	↑
nAChR α 7	↑	→	↑
mAChR3	→	(↓)	↑
SLURP1	↑	(↓)	→
ACh	→	→	↑

In der AID-Haut liegt bereits eine Dysregulation innerhalb des Immunsystems und der Zytokine aufgrund der Entzündung der Haut vor [289]. Unklar ist, ob das NNCS hierbei protektiven oder destruktiven Einfluss besitzt. In der qPCR kam es zu einer Reduktion der ChAT Expression. Passend hierzu konnte in der AID eine reduzierte ACh-Konzentration mittels HPLC nachgewiesen werden. Interessanterweise blieb der nAChR α 7 in entzündeter Haut unverändert, jedoch wurde dessen Ligand SLURP1

herunterreguliert. Zusätzlich war die Expression des mAChR3 in der AID reduziert (Tabelle 20).

Zusammengefasst kommt es in der AID zu einer partiell reduzierten Expression des kutanen NNCS. Diese dient möglicherweise dem Versuch, u.a. durch den Einfluss von mAChR3 auf BDNF, der resultierenden Inhibition von TNFR5 und der unveränderten nAChR α 7-Expression mit Erhaltung des TNFR1 Signalweges, die Immunbalance in Richtung TH1 zu stabilisieren (Tabelle 20).

In der Gruppe Stress+AID wurden alle Schlüsselspieler des NNCS im Vergleich zur AID hochreguliert (Tabelle 20). Dies kann unter Berücksichtigung der oben genannten funktionellen Zusammenhänge als Zusammenbruch der in der AID attestierten protektiven Eigenschaften des NNCS verstanden werden. Das Aufeinandertreffen des entzündlichen und mentalen Stressors resultiert in einer AID-förderlichen Dysregulation des NNCS und trägt zur Verschlechterung der AID bei.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse belegen erstmals den Einfluss unterschiedlicher Stressoren (Lärm/Entzündung) auf das kutane NNCS im Tiermodell. Die Literaturrecherche ergab, dass cholinerge Elemente in der Haut zahlreich zu finden sind [166, 290]. Neben einer dichten cholinergen Innervation exprimieren auch Hautzellen cholinerge Marker. Eine detaillierte Analyse des NNCS unter Lärmstress oder Entzündung ist bisher nicht durchgeführt worden, jedoch zeigten die Untersuchungen von Curtis et al. den Zusammenhang zwischen der Hautreaktion auf Stress und dem NNCS [200]. Zusätzlich konnten Peters et al. erstmals Veränderungen cholinergischer Marker in einem humanen Versuchsmodell für die AD zeigen [8].

Abschließend kann festgestellt werden, dass Stress, AID und insbesondere deren Kombination modulierend auf die neuroimmune Kommunikation der Haut wirkt und die Expression relevanter NNCS-Marker beeinflusst.

4.3 Acetylcholin reagiert auf Stress in der AID

Nachdem bereits die Analyse des NNCS auf molekularer Ebene Dysregulationen, insbesondere in der Haut gestresster AID-Tiere, aufzeigte, wurden in dieser Arbeit die ACh-Konzentrationen in den Hautbiopsien mittels HPLC bestimmt (Tabelle 20).

In diesen Untersuchungen konnten keine veränderten ACh-Konzentrationen in der Haut der Stress- oder AID-Gruppe festgestellt werden. Interessanterweise steigerte aber zusätzlicher Stress die ACh-Konzentration in der AID-Haut. Dieser Anstieg stimmt mit dem generell in der Stress+AID-Gruppe festgestellten Anstieg aller NNCS-Marker und

der erhöhten Aktivität des NNCS überein und trägt zur Hochregulation und Aktivierung des NNCS bei.

Die bisher bekannten Untersuchungen der ACh-Konzentrationen wurden in humanen Hautbiopsien durchgeführt. Bereits 1995 zeigten Vogelsang und Heyer, dass ACh Teil der immunregulatorischen Abläufe der AD sein könnte. Die Injektion von ACh in die Haut von AD-Patienten resultierte in starkem Juckreiz, dem Leitsymptom der AD. In der Haut gesunder Probanden kam es hingegen nur zu einem leichten Brennen [198, 199]. Zusätzlich zeigten Wessler et al., dass in der Haut von AD-Patienten erhöhte ACh-Konzentrationen gemessen werden konnten [197]. Möglicherweise könnte der vermehrte Juckreiz durch die Aktivierung kutaner MZ erklärt werden, da diese durch ACh aktiviert werden können [214].

In dieser Arbeit wurden erstmals Ergebnisse einer kutanen ACh-Messung aus einem murinen AID-Modell vorgestellt. Interessant ist hierbei, dass die künstliche induzierte AID allein zu keiner Erhöhung der ACh-Konzentration führt und somit sich gegenläufig zu den von Wessler et al. gezeigten Messungen aus humanen Hautbiopsien verhält [197]. Zusätzlicher Stress hingegen führt zu einem signifikanten Anstieg des kutanen AChs, obwohl gleichzeitig die ACh-abbauenden Enzyme AChE und BChE stark hochreguliert sind (Tabelle 20). Dies lässt auf eine starke ACh-Synthese schließen. Dieser Unterschied in den ACh-Konzentrationen zwischen den humanen Proben bei Wessler et al. und den hier getesteten murinen Proben könnte durch die unterschiedlichen Organismen, die experimentelle AID oder die schwer zu kontrollierenden Einflussfaktoren in einem humanen Versuchsmodell erklärt werden.

Die Schwierigkeit eines humanen Modells ergibt aus den individuellen Unterschieden in der Stresswahrnehmung, verschiedene Formen und Schweregrade der AD und die schwierige Steuerung exogener Einflussfaktoren. Eine höhere Validität und Reliabilität gewährleistet das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell. Das AID-Stress-Modell macht die oben genannten Störfaktoren in Teilen kontrollierbar und gilt als etablierte Methodik für eine künstliche, der AD-ähnlichen, induzierte allergische Dermatitis [268, 291-293]. Da die AD neben ihrer entzündlichen Komponente auch als mentaler Stressor wirkt, könnten die im Menschen erhobenen ACh-Konzentrationen am ehesten den gestressten AID-Tieren entsprechen.

Trotz einer möglicherweise eingeschränkten Übertragbarkeit auf den Menschen ergeben sich, insbesondere bei Berücksichtigung der erhobenen Ergebnisse aller NNCS-Marker in der Haut, neue Erkenntnisse über eine veränderte kutane ACh-Konzentration in Entzündung und Stress und dessen Zusammenspiel mit dem NNCS.

4.4 Regulation cholinergischer Zielstrukturen in der Haut

4.4.1 Zytokine werden unter Stress und Entzündung reguliert

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, werden in der Literatur unterschiedliche Konzepte für die Entstehung der AD diskutiert [175]. Weitestgehend akzeptiert ist die Annahme, dass die AD eine mit einer vorliegenden TH2-Dominanz, erhöhtem IgE und einer Eosinophilie einhergehende Erkrankung ist [184, 294]. Die Einführung des TH1/TH2-Paradigmas führte zu einer neuen Betrachtung der Pathogenese, gleichzeitig jedoch zu einer starken Vereinfachung der komplexen Zusammenhänge.

Die Unterteilung in TH1- und TH2-Zellen nach deren zugehörigen spezifischen Zytokinen trifft im murinen Tiermodell weitestgehend zu [295]. Im Menschen kann diese Einteilung ebenso gefunden werden. Jedoch ist dort die Verteilung der Zytokine heterogener und komplexer. Zusätzlich haben neue Untersuchungen gezeigt, dass sich das dominierende Zytokinprofil der AD im Krankheitsverlauf verändert. Zu Beginn der Erkrankung liegt ein TH2-Profil vor, jedoch kommt es im chronischen Stadium (>48 Std.) der AD zu einem vorwiegend TH1-spezifischen Zytokinprofil [175, 296]. Grundlage bildete dabei eine Analyse von IL-2 und IFN- γ als TH1-Zytokine und IL-4, IL-5 und IL-10 als TH2-Zytokine [297]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass neben TH1 und TH2 weitere TH-Subtypen existieren und die Betrachtungsweise im Rahmen des TH1/TH2-Paradigmas überdacht werden muss [298, 299]. Diese Untersuchungen zeigen auch, dass die Pathogenese und der Krankheitsverlauf der AD einer komplexeren Regulation als bisher angenommen unterliegen. Es kann jedoch angenommen werden, dass die AD-Entstehung durch eine dominierende TH2-Immunität gefördert wird, es aber im Verlauf der Erkrankung durch Einwanderung von Eosinophilen und Makrophagen zum beobachteten TH1-Shift kommt [295].

In der Literatur hat sich der Begriff der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine als Synonym für TH1- und TH2-Zytokine etabliert. Diese Vereinfachung muss kritisch betrachtet werden, da die pro- oder anti-inflammatorische Wirkung der Zytokine von der jeweiligen Erkrankung und deren Stadium abhängt. So hat die Verschiebung oder das vermehrte Auftreten von TH1-Zytokinen im Rahmen der AD sogar einen anti-inflammatorischen, antiallergischen Effekt, da es die Immunbalance fördert. Dies zeigt sich unter anderem an der mangelnden Effektivität des Einsatzes spezifischer TNF α -Blocker [300].

Kommt es zu Fehlregulationen der Zytokinkonzentration ist keine kontrollierte Immunantwort möglich. Dies resultiert in einer zu schwachen oder überschießenden Reaktion. Das Immunsystem unterliegt einer komplexen Steuerung durch verschiedene

Diskussion

einflussnehmende Mechanismen, von denen einer das NNCS sein könnte (Abbildung 6).

Die in dieser Arbeit durchgeführte molekulare Analyse der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine fokussierte sich auf die mit dem NNCS-assoziierten Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF- β , die, neben IL-10, nicht zur klassischen Riege untersuchter Zytokine im Rahmen der AD gehören [295] (Tabelle 21).

Tabelle 21 Übersicht der qPCR Ergebnisse der TH1- und TH2-Zytokine und derer Rezeptoren

Pfeile stellen signifikante Expressionsveränderungen zur Vergleichsgruppe dar ($p \leq 0,05$); Pfeile in Klammern zeigen Trends ($0,05 > p > 0,10$).

Gen	Stress (vs. Kontrolle)	AID (vs. Kontrolle)	Stress+AID (vs. AID)
TNF α	→	→	↓
IL-1 β	→	→	↓
IL-10	(↓)	→	↓
TGF- β	→	→	↓
TNFR1	→	↓	(↓)
TNFR5	↑	↑	→
IL-1R1	↓	↓	↓
IL-10RB	→	→	↓

Hierbei zeigte sich, dass diese Zytokine, ähnlich dem NNCS, keiner stressabhängigen Regulation unterliegen. Insbesondere der ausbleibende Anstieg von TNF α und IL-1 β könnte jedoch mit der erhöhten nAChR α 7-Expression unter Stress zusammenhängen (Tabelle 20). Interessanterweise konnte auch für die AID keine signifikante Veränderung der einzelnen Zytokine festgestellt werden. Die in der Literatur beschriebene vermehrte TH2-Expression zu Beginn der AID konnte für die NNCS-assoziierten Zytokine nicht bestätigt werden. Begründbar wäre dies durch die Tatsache, dass die NNCS-assoziierten Zytokine nicht den o.g. klassischen AD-Zytokine entsprechen [295]. Zusätzlich dauerte die im AID-Stress-Modell verwendete AID 48 Std. an und liegt damit am Übergang zwischen akutem und chronischem Verlauf, also im möglichen Übergang in ein TH1-Zytokinprofil. Zusätzlich kann in den in der Literatur erhobenen Ergebnissen aus einem humanen Modell der Einfluss von Stressoren und deren individuelle Wahrnehmung auf die AD, wie in Kapitel 4.3 diskutiert, nicht ausgeschlossen werden.

Der Einfluss von Stress auf die Aktivität der AD konnte bereits mehrfach in der Literatur nachgewiesen werden [13]. Dieser zeigte sich auch in den Tieren der Stress+AID-

Gruppe. Hierbei kam es zu einer signifikanten Herunterregulation aller Zytokine im Vergleich zur AID. Insbesondere der Abfall der TNF α und IL-1 β Expression fügte sich mit dem Anstieg des nAChR $\alpha 7$ zusammen. Der gleichzeitige Abfall der TH2-Zytokine IL-10 und TGF- β könnte auf eine mögliche schützende Gegenregulation hinweisen.

Bildet man einen Quotienten aus qPCR-Daten der bekanntesten Zytokinen der jeweiligen TH-Gruppen TNF α und IL-10 und setzt diesen in Relation zur Kontrollgruppe, zeigt sich das in der Literatur beschriebene und bekannte Bild der TH-Immunität (Abbildung 22) [13].

IL-10/TNF α Quotient

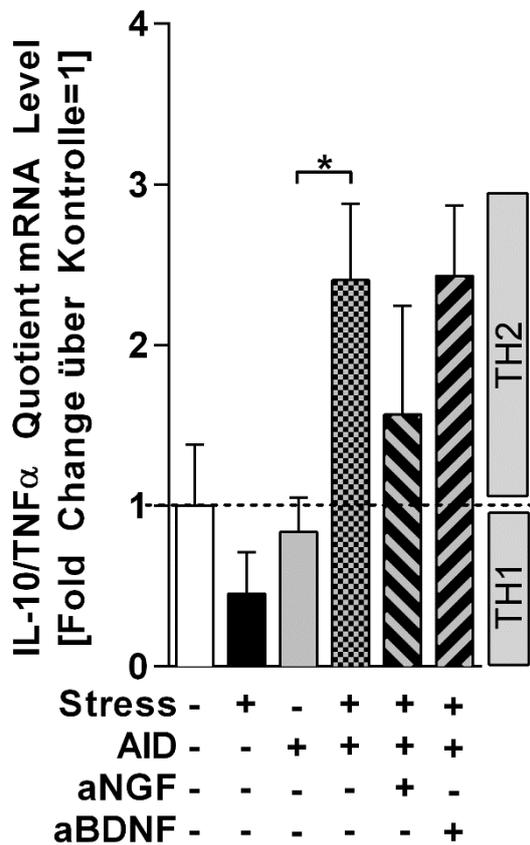


Abbildung 22 IL-10/TNF α Quotient

Die im AID-Stress-Modell gewonnenen Hautbiopsien muriner Vollhaut wurden wie unter Kapitel 2.2.5 beschrieben verarbeitet. Anschließend wurde mittels qPCR (siehe 2.2.10) die Expression von IL-10 und TNF α analysiert und deren Quotient errechnet. Die Ergebnisse wurden zur internen Kontrolle normalisiert und in Relation zur Kontrollgruppe gesetzt. Hierbei wurden je Gruppe die Proben von fünf unterschiedlichen Tieren verwendet. *= $p \leq 0,05$.

Im Rahmen des AID-Stress-Modells wurde ein 24-stündiger Stressor verwendet, der als subchronischer Stressor einzuordnen ist. Es zeigte sich eine moderate Verschiebung

des Zytokinprofils in Richtung TH1, wie es für einen akuten-subchronischen Stressor zu erwarten wäre [158, 301]. Für die AD wird die Verschiebung des Profils von initial TH2 zu TH1 nach rund 24-48 Std. diskutiert [158].

Die AID-Gruppe zeigte einen mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Quotienten. Dies könnte als möglicher Übergang in die sich nach 48 Std. einstellende TH1-Immunität im chronischen Verlauf zu interpretieren sein. Interessanterweise zeigte die Kombination von AID und Stress eine deutliche Verschiebung in Richtung TH2. In der AID nimmt der Stress also eine TH2-fördernde Rolle ein. Diese Tatsache unterstützt die Beobachtung einer akuten Verschlechterung der AD unter Stress und entspricht den durch Peters et al. festgestellten Veränderungen [13]. Dies geschieht, zusätzlich zur Förderung der neurogenen Entzündung, durch Freigabe spezifischer Stressmediatoren auf Ebene des Immunsystems. Die proallergische TH2-Bilanz bleibt trotz einer Herunterregulation aller TH1- und TH2-Zytokine in der Stress+AID-Gruppe bestehen (Tabelle 21 & Abbildung 22).

4.4.2 Zytokinrezeptoren tragen zur TH2-Dominanz bei

Neben der Möglichkeit die Ausrichtung der Immunbalance über eine variierende Zytokinexpression zu regulieren, kann auch die Expression der entsprechenden zugehörigen Rezeptoren reguliert werden. Durch Analyse der Expression dieser Rezeptoren kann ein Rückschluss auf die aktuell dominierende TH-Immunität geschlossen werden. Wie bereits unter Kapitel 4.1 beschrieben, beeinflussen TNFR1 und TNFR5 unterschiedliche Signalwege und werden durch Zellen, die diesen Signalwegen zugehören, exprimiert (siehe 4.1). Die Zytokinrezeptoren IL-1R1 und IL-10RB binden spezifisch die jeweiligen Zytokine und können durch vermehrte oder verminderte Expression die Signalkaskade beschleunigen oder verlangsamen.

Die in dieser Arbeit bestimmten mRNA-Level bestätigten den initial im Microarray unter Stress festgestellten Trend. Hierbei kommt es, wie in der Literatur beschrieben, zu einer verstärkten TH2-Ausrichtung, die sich in erhöhter Expression von TNFR5 und verminderter IL-1R1-Expression widerspiegelt. In der AID verdeutlichte sich dieser Trend. Die Kombination beider Stressoren führte zu einer ausgeprägten Verschiebung in Richtung TH2-Immunität durch Herunterregulation beider TH1-Rezeptoren. Interessant hierbei ist, dass das Expressionsmuster der Zytokinrezeptoren ein klareres Muster aufzeigt als es deren Zytokine zulassen. Stress allein zeigte keinen Einfluss auf die Zytokine, der Quotient aus IL-10 und TNF α zeigte eine Verschiebung in Richtung TH1, die Rezeptoren hingegen werden durch Stress reguliert und verändern ihre Expression in Richtung TH2. Möglicherweise ist die Regulierung der hier analysierten

Rezeptoren somit der entscheidendere Schritt in der Ausrichtung der Immunität. Wegen der Vielzahl möglicher Interaktionspartner der Zytokine können diese auch noch andere Rezeptoren binden. Dies ist eine mögliche Erklärung für eine von Rezeptoren abweichende Expression.

Zusammenfassend kann auch auf Ebene der NNCS-assoziierten Zytokinrezeptoren eine durch Stress und Entzündung beeinflusste Regulation bestätigt werden, die bei Aufeinandertreffen beider Stressoren eine AD-förderliche Dysregulation zur Folge hat.

4.5 NGF und BDNF beeinflussen das NNCS und dessen Zielstrukturen

Die beiden Stressmediatoren NGF und BDNF sind im Rahmen der Stressantwort und allergischen Erkrankungen, wie der AD, bekannt [98, 302]. Insbesondere NGF war bei gesunden, aber gestressten Probanden erhöht nachweisbar und konnte durch Entspannungsübungen reduziert werden. Bei AD-Patienten und Mäusen mit Neigung zu einer spontanen AID konnte NGF in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden.

Neben NGF konnte auch BDNF als zentraler, aber auch lokaler Stressmediator identifiziert werden. In der Literatur wird ein Anstieg der BDNF-Level im Serum von AD-Patienten beschrieben [303]. Bei erfolgreicher Behandlung der AD kommt es zu einem Abfall der BDNF-Level. Es wird vermutet, dass BDNF die Apoptose eosinophiler Granulozyten verhindert und die Chemotaxis zusätzlich verstärkt. Diese Mechanismen könnten zu einer BDNF-abhängigen Verschlechterung der AD beitragen [304].

Neben dieser vorwiegend systemischen Wirkung können diese beiden NTR auch in peripheren Geweben und deren Zellen, u.a. MZ und anderen Immunzellen, nachgewiesen werden. Sie ermöglichen die interzelluläre und zelluläre-neuronale Kommunikation und steuern lokale Stressreaktionen [305].

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell konnten Peters et al. nachweisen, dass die in vivo Blockade von NGF zu einer Verbesserung der AID führt [12]. Die hier durchgeführte Analyse des Einflusses von NGF und BDNF auf das NNCS und mit diesem in Kontakt stehende Strukturen unterstützten diese Beobachtung und verdeutlichten die entscheidende Rolle von NGF (Tabelle 22).

Auf Ebene des NNCS führte die Blockade von NGF zu einer Herunterregulation des nAChR α 7 und mAChR3. Bei Betrachtung des Microarray-Schemas führt diese Veränderung der Expression zu einem Shift in Richtung TH1-Immunität (Abbildung 6). Dieses Bild spiegelte auch der gebildete Zytokin-Quotient wider (

Diskussion

Abbildung 22). Der nachgewiesene Anstieg von IL-1 β , IL-1R1 und TNFR1 unterstützt den gesehenen Trend in Richtung einer TH1-Immunität.

Der BDNF-Block führte zu keiner auf die Immunbalance wirksamen Veränderung der Genexpression. Dies zeigte auch die unveränderte Expression der Stress+AID+aBDNF-Gruppe im gebildeten IL-10/TNF α Quotienten (Abbildung 22). Insbesondere die nicht veränderte Expression der AChR könnte hierfür ursächlich sein. Auffällig bei der Untersuchung der Ergebnisse war jedoch, dass die Blockade von BDNF zu einem signifikanten Abfall der ACh-Konzentration führte. Der hieran beteiligte Mechanismus ist unbekannt, führt aber zu einer verminderten Aktivierung des NNCS und resultiert so möglicherweise in einer Beeinflussung des Immunsystems. Weiterhin könnte er den Anstieg der IL-1 β -Expression erklären.

Tabelle 22 Übersicht der qPCR- und HPLC-Ergebnisse nach anti-NGF oder anti-BDNF Behandlung

Pfeile stellen signifikante Expressionsveränderungen zur Vergleichsgruppe dar ($p \leq 0,05$); Pfeile in Klammern zeigen Trends ($0,05 > p > 0,10$).

Gen	Stress+AID+aNGF (vs. Stress+AID)	Stress+AID+aBDNF (vs. Stress+AID)
ChAT	→	→
VAcHT	→	↑
AChE	↓	→
BChE	→	(↓)
nAChR α 7	↓	→
mAChR3	↓	→
SLURP1	↑	→
ACh	(↓)	↓
TNF α	→	→
IL-1 β	↑	↑
IL-10	→	→
TGF- β	→	→
TNFR1	↑	→
TNFR5	→	→
IL-1R1	↑	→
IL-10RB	↑	↑

Zusammenfassend unterstützen die hier gezeigten Ergebnisse die antiallergische Wirksamkeit einer Blockade von NGF und liefern erste Hinweise auf einen möglichen

Mechanismus, der durch das NNCS kontrolliert wird. Die Blockade von BDNF konnte in Verbindung mit dem NNCS keine relevanten Veränderungen aufzeigen.

4.6 Mastzellen sind ein aktiver Teil des non-neuronalen cholinergen Systems

Ihre Komplexität und Heterogenität ermöglicht es den MZ sich kontinuierlich an wechselnde Bedingungen anzupassen und ihre Funktion an die aktuellen Anforderungen auszurichten. Insbesondere ihre strategische Position in der Nähe von Blutgefäßen oder NF in der Haut ermöglicht ihnen eine direkte Interaktion mit systemischen Veränderungen außerhalb ihres lokalen Milieus [72]. Durch Kommunikation mit anderen Zellen können MZ diese Signale in das jeweilige Gewebe übertragen und durch Abgabe spezifischer Mediatoren eine Immunreaktion einleiten. Diese Einbindung der MZ wird durch die Expression unterschiedlicher Rezeptoren und Mediatoren ermöglicht [25]. Ihre Integration in die lokale und systemische Stressreaktion zeigt die Expression spezifischer Rezeptoren für die Schlüsselmediatoren der SA, HHNA und verschiedene NT und NP [25]. Unklar ist bisher, ob MZ auch Teil des kutanen NNCS sind und welche mögliche Funktion sie in diesem übernehmen. Vereinzelt wurde durch immunhistologische Untersuchungen in anderen Geweben gezeigt, dass MZ ChAT, AChE und nAChR α 7 exprimieren [25, 260, 261]. In der Haut sind diese Expressionen und deren Funktion bisher ungeklärt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Expression NNCS-assoziiierter Proteine kutaner MZ in murinen Vollhautbiopsien mittels Immunhistochemie untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass kutane MZ Teil des kutanen NNCS sind (Abbildung 13).

Die festgestellte ChAT-Expression in kutanen MZ konnte durch den Einsatz genetisch veränderter ChAT-eGFP Mäuse verifiziert werden (Abbildung 13). Der Nachweis der AChR gestaltete sich aufgrund bereits bekannter Spezifitätsprobleme der angebotenen AK schwierig [263, 282]. Eine spezifische Färbung von mAChR3 war nicht möglich, jedoch zeigte ein getesteter nAChR α 7-AK keine Färbung in der α 7-KO Haut und wurde für die hier durchgeführten Analysen verwendet (Abbildung 13).

4.6.1 Mastzellen verändern ihre ChAT-Expression in der AID

Da vor allem die eigenständige Produktion von ACh für die Zugehörigkeit einer Zelle zum NNCS entscheidend ist, wurde die ChAT-Expression der MZ im Rahmen der unterschiedlichen Gruppen des AID-Stress-Modells untersucht.

Die Analyse des Anteils der ChAT+ MZ ergab ein mit den qPCR-Ergebnissen für die Vollhaut vergleichbares Bild. Stress allein zeigte keinen Einfluss auf die MZ. In der AID kam es zu einer deutlichen Abnahme der ChAT+ MZ, zusätzlicher Stress hob diesen

Effekt wieder auf. Interessant war hierbei, dass dieser Effekt durch die Blockade von BDNF sogar noch weiter verstärkt wurde und so der höchste Anteil ChAT+ MZ gemessen werden konnte (Tabelle 23). Der hierfür verantwortliche Mechanismus ist jedoch bisher unbekannt. Zusätzlich fiel auf, dass sich MZ hinsichtlich der Stärke ihrer ChAT Expression unterscheiden. Der Anteil stark ChAT+ MZ unter Stress und in der AID ist erhöht, gleichzeitig ist der Anteil der schwach ChAT+ MZ verringert. Die Kombination aus Stress und AID führte zu einer Abnahme der stark ChAT+ MZ, gleichzeitig nahm der Anteil schwach positiver MZ zu. Die Blockade von NGF oder BDNF zeigte keinen weiteren Einfluss auf das ChAT-Expressionsmuster (Abbildung 14B).

Diese Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass die ChAT-Expression in den kutanen MZ durch Stress und Entzündung beeinflusst wird. Die ChAT-Expression in MZ folgt dabei einem ähnlichen Muster, wie bereits für die gesamte Haut auf mRNA-Ebene gezeigt (Tabelle 20). Gleichzeitig spiegelt auch die gemessene ACh-Konzentration ein vergleichbares Bild wider. Die detailliertere Analyse der ChAT-Expression MZ offenbarte jedoch ein weiteres interessantes Ergebnis: Der ChAT-Gehalt der MZ verhält sich gegenläufig zum Anteil der ChAT+ MZ. Dies bedeutet, dass MZ in der AID möglicherweise nicht der protektiven Herunterregulation des NNCS folgen, wie es der verminderte Anteil ChAT+ MZ vermuten lassen würde, sondern vermehrt das ACh-produzierende Enzym ChAT bereitstellen. Interessanterweise ist dieser Effekt unter Stress+AID erneut gegenläufig und das ChAT-Protein wird vermindert exprimiert. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch mit den reduzierten ACh-Leveln in der AID-Haut, die mittels HPLC bestimmt wurden. Dies lässt den Schluss zu, dass das durch MZ bereitgestellte ACh nur eine untergeordnete Rolle für den gesamten ACh-Gehalt der Haut spielt. Der größte Anteil des ACh stammt von den zahlreich vorhandenen Keratinozyten oder erreicht über NF oder den Blutkreislauf die Haut [23, 166].

Zu spannenden Ergebnissen führte hierbei auch der Einsatz der spezifischen NGF und BDNF AK. In der gesamten Haut führen diese zu einer Abnahme des AChs, erhöhen aber den Anteil der ChAT+ MZ.

Somit zeigte sich für die ChAT-Expression auf Ebene der MZ ein mit der gesamten Haut vergleichbarer Trend, der für die MZ einen auf Ebene des NNCS für die AID protektiven, TH1-fördernden Effekt offenbart. Kommt neben dem entzündlichen Stress ein zweiter Stressor in Form von Lärm hinzu, verändert sich der Anteil ChAT+ MZ in Richtung einer proallergischen Ausrichtung. Hierbei schien insbesondere BDNF kompensatorisch einzugreifen, da dessen Blockade diese Expressionsveränderung und den TH2-Shift verstärkte. Die detailliertere Analyse der ChAT-Expression in MZ erwies jedoch ein

gegenläufiges Verhalten der MZ im Rahmen der Expressionsstärke der ChAT. Inwieweit MZ somit eventuell versuchen, dem in der AID auf Ebene des Anteils ChAT+ MZ gesehen protektiven Trend entgegenzusteuern, erfordert weitergehende Untersuchungen auf MZ-Ebene. Hierfür müssten MZ-spezifische ACh-Messungen zeigen, ob die vermehrte ChAT-Expression mit erhöhten ACh-Leveln einhergeht.

4.6.2 Der nAChR α 7 der Mastzellen schützt in der AID

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen lag der Fokus weiterhin auf der Expression des nAChR α 7 in MZ, da dieser, wie aus dem Microarray ersichtlich, einen direkten Einfluss auf die Expression der TH1-Zytokine TNF α und IL-1 β besitzt [172, 280, 306].

Wie schon für nAChR α 7 in der gesamten Haut auf molekularer Ebene festgestellt, stieg auch dessen Expression in MZ unter Stress an. In der AID hingegen fiel der Anteil der nAChR α 7-positiven MZ ab. Die Kombination aus entzündlichem und mentalem Stressor steigerte den Anteil der nAChR α 7-positiven MZ. Bemerkenswerterweise konnte die Blockade von NGF oder BDNF diesen Effekt aufheben (Tabelle 23).

Tabelle 23 Übersicht der immunhistochemischen Ergebnisse in Mastzellen

Pfeile stellen signifikante Expressionsveränderungen zur Vergleichsgruppe dar ($p \leq 0,05$).

Gen	Stress (vs. Kontrolle)	AID (vs. Kontrolle)	Stress+AID (vs. AID)	Stress+AID+aNGF (vs. Stress+AID)	Stress+AID+aBDNF (vs. Stress+AID)
ChAT	→	↓	↑	→	↑
nAChR α 7	↑	↓	↑	↓	↓
TNF α	→	↑	↓	↓	↓
IL-1 β	↑	↑	↓	→	→
IL-10	→	↓	↑	→	↓
TGF- β	→	↓	↑	↓	→

Zusammenfassend spiegelte auch die Expression von nAChR α 7 den bisher für das NNCS der gesamten Haut festgestellten regulatorischen Trend wider. Die Herunterregulation in der AID könnte durch Freigabe der TH1-Zytokine TNF α und IL-1 β als antiallergisch interpretiert werden. Kommt es zu einem zusätzlichen Stressor führt dies zu einer Expressionssteigerung des Rezeptors und Verstärkung der allergischen Entzündungssymptomatik. Die Blockade der NT resultierte in einer Aufhebung dieses Effektes, war für die Blockade von NGF noch ausgeprägter und fügte sich zu der unter NGF-Blockade beobachteten Besserung der Entzündung [12].

Im Rahmen der AID kann den MZ ein schützender Mechanismus attestiert werden, der jedoch beim Aufeinandertreffen zweier Stressoren zusammenbricht und die AID fördert.

4.6.3 Mastzell-Zytokine schützen in der AID, fördern diese aber unter Stress

Kutane MZ sind Ziel und Quelle der unterschiedlichen Zytokine. Sie bilden die größte TNF α -Quelle in der Haut, können aber auch andere Zytokine aktiv sezernieren (siehe 1.5.2).

Die Betrachtung der TH1- und TH2-Zytokine in MZ konnte keine Veränderung der Expression unter Stress nachweisen. Der fehlende Anstieg von TNF α im Vergleich zu IL-1 β könnte mit dem Anstieg der nAChR α 7 in Zusammenhang stehen. In der AID nehmen die TH1-Zytokine in MZ zu, die TH2-Zytokine hingegen ab. Eine mögliche protektive Gegenregulation der MZ durch vermehrte Abgabe der TH1-Zytokine und gleichzeitiger Reduktion der TH2-Zytokine in der AID wäre denkbar. Die unter Stress beobachtete Verschlechterung der AID spiegelt sich auch bei Betrachtung der Zytokine in MZ wider. Zusätzlicher Stress steigerte die TH2-Zytokine in MZ und senkte gleichzeitig die Expression antiallergischer TH1-Zytokine. Hierbei fiel auf, dass sich insbesondere die durch nAChR α 7 regulierten Zytokine TNF α und IL-1 β gegenläufig zur gesehenen Rezeptorexpression verhielten. Interessant war, dass die Applikation von NGF oder BDNF auf Ebene der MZ keinen antiallergischen Effekt für die Expression der Zytokine auszulösen schien. Der Anteil der TNF α + MZ fiel weiter ab, die IL-1 β + MZ blieben auf konstant niedrigem Niveau. Jedoch sank parallel auch der Anteil der TH2-Zytokin positiven MZ (Tabelle 23).

4.6.4 Fazit der Mastzellanalyse im Rahmen des NNCS

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass kutane MZ ein aktiver Teil des NNCS sind. Sie exprimieren alle nötigen und relevanten Schlüsselspieler. Ebenso, wie für die Vollhaut auf molekularer Ebene gezeigt werden konnte, reagierte das NNCS der MZ und dessen Zielstrukturen unter Stress nur moderat. In der AID nimmt das NNCS und dessen Zielstrukturen auf Ebene der MZ möglicherweise eine antiallergische, protektive Rolle ein. Diese bricht jedoch durch einen zusätzlichen Stressor zusammen und ermöglicht eine AD-förderliche Ausrichtung der MZ. Der Einsatz der NT-Blocker führte auf Ebene des NNCS zu einer Aufhebung des Effektes, spiegelte sich jedoch nicht auf Zytokinebene wider (Tabelle 23).

4.7 Mastzellproteasen spielen eine komplexe Rolle in der Interaktion von Stress und AID

Wie bereits in Kapitel 1.5.2 beschrieben gehören MZP zu den am häufigsten in MZ vorhandenen Mediatoren. Die Entwicklung spezifischer MZP-KO Mausstämme hat Einblicke in die Komplexität und Relevanz der MZP ermöglicht. Insbesondere Pejler et al. und Caughey et al. gelten als führende Experten auf dem Gebiet der MZP [28, 216, 217, 307]. Sie zeigten, dass MZP entweder eigenständig agieren oder mit dem Immunsystem interagieren können. Ihre Funktion variiert je nach Situation oder Erkrankung und umfasst neben pro-inflammatorischen auch protektive Eigenschaften [26, 28].

Grundlage der hier durchgeführten Untersuchungen bilden die murine Chymase MZP4 und Trypsase MZP6, da diese die größte Ähnlichkeit zu den humanen MZP zeigen (Tabelle 2). Hierbei scheint vor allem die MZP4 einen protektiven und die MZP6 einen destruktiven Charakter zu besitzen [220, 222, 223, 242, 308-314]. Auch wenn diese Aussage in vielen Punkten zutreffend ist, konnten auch für MZP6 protektive Funktionen nachgewiesen werden [221, 242]. Die Komplexität der MZP-Funktionen zeigte sich auch in der Haut. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die orale Applikation eines Chymasen-Inhibitors zu einer Verbesserung der AID führt. Dies wäre durch den dann verminderten Abbau des antiallergischen TNF α durch MZP4 erklärbar [223]. Im Gegensatz hierzu übernimmt die MZP4 die Spaltung von SP, dem entscheidenden Mediator der stressbedingten Verschlechterung der AID im Mausmodell [12, 27].

Um herauszufinden, welchen Einfluss Stress auf die Expression der MZP in der Haut hat, wurden die Analysen im Rahmen des AID-Stress-Modells auf molekularer Ebene und Proteinebene durchgeführt.

4.7.1 Entzündungshemmende Hochregulation der Mastzellprotease 4 in der AID

Die Betrachtung der Proteinexpression in MZ zeigte, dass der Anteil MZP4+ MZ in der AID zunimmt und es in Kombination mit Stress zum höchsten Anteil MZP4+ MZ kommt. Dieser Anstieg konnte durch die Applikation eines spezifischen NGF AKs aufgehoben und auf Kontrollniveau gesenkt werden (Abbildung 18 A). Gleichzeitig zeigte die detailliertere Analyse der MZP4-Expression, dass der Anstieg MZP4+ MZ von einer Zunahme schwach- und Abnahme stark MZP4+ MZ begleitet wird. Zusätzlich konnte MZP4 in direkter Umgebung der MZ in entzündeter Haut nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf eine aktive Sekretion der MZP4 zu (Abbildung 18 B & C). Die Analyse der MZP6+ MZ innerhalb des Tiermodells zeigte keine Veränderungen (Abbildung 19).

Zusammengefasst verhält sich die MZP-Proteinexpression, insbesondere von MZP4, ergänzend zur bereits publizierten SP-Reaktivität im AID-Stress-Modell [13]. Die Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass MZ neben ihrer entzündungsfördernden Komponente gleichzeitig durch Hochregulation und aktiven Sekretion der MZP4 einen gegenregulatorischen Versuch unternehmen, die neurogene Entzündung durch MZP4-abhängige Spaltung des Schlüsselspielers SP einzudämmen.

4.7.2 Der nAChR α 7 stabilisiert die MZP4-Expression in Mastzellen

In einem nächsten Schritt sollte im Rahmen der PMZK die Effekte und Interaktion von SP mit den MZP untersucht werden. Hierbei lag der Fokus auf einer möglichen Abhängigkeit der MZP-Expression von cholinergen Signalwegen, die unter anderem durch den von MZ exprimierten nAChR α 7 reguliert werden könnten.

Die Analyse der zugrunde liegenden Mechanismen ist hierbei bis heute problematisch. Diese können nur eingeschränkt untersucht werden, da sich die Isolation und Kultivierung der MZ komplex gestaltet [315].

Zur Verfügung stehen hierbei unterschiedliche *in vitro* und *in vivo* Methoden. Die Schwierigkeit der Kultivierung zeigt sich bereits im natürlichen Vorkommen und den damit verbundenen Eigenschaften der MZ [316]. Sie sind fest in das Gewebe integriert und stehen mit anderen Zellen in Kontakt. Die direkte Isolation, z.B. aus der Haut, gestaltet sich mühsam und resultiert in einer zu geringen Zellzahl. Gleichzeitig verändern sich isolierte MZ, da sie nicht mehr in ihr Mikromilieu eingebettet sind. Die Isolation peritonealer oder aus dem Knochenmark stammender MZ ermöglicht die Gewinnung größerer Mengen MZ. Zum einen sind die MZ aus dem Knochenmark jedoch Vorläuferzellen, die noch nicht endgültig differenziert sind, zum anderen sind peritoneale MZ aus einem anderen Milieu als kutane MZ. Insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung spezifischer Rezeptoren können sich MZ zwischen unterschiedlichen Geweben stark unterscheiden. Somit ist die Übertragbarkeit selbst innerhalb eines Organismus erschwert, kann jedoch erste Erkenntnisse über mögliche funktionale Zusammenhänge erbringen.

Als weitere Alternativen stehen kommerziell erhältliche Zelllinien zur Verfügung, diese sind jedoch nur eingeschränkt und nur für bestimmte Untersuchungen zu empfehlen [315, 317].

Die Entwicklung spezifischer *in vivo* Modelle, basierend auf dem genetischen KO von MZ oder bestimmter MZ-Proteine, ermöglichte zunehmende Einblicke in deren Rolle im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen. Diese Modelle können genaue Aussagen zur

Diskussion

Relevanz der MZ oder zur Funktion der durch MZ exprimierten Proteine machen. Sie gehen jedoch mit einem hohen Aufwand einher und hängen stark vom jeweilig verwendeten Mausstamm ab [315].

In dieser Arbeit wurden die Zellkulturexperimente mit peritonealen gewonnenen MZ durchgeführt, da diese aus der gleichen Spezies stammen, eine höhere Differenzierung als aus dem Knochenmark stammende MZ aufweisen und die Durchführung der Zellkultur-Experimente hohe Zellzahlen erforderten.

Zur Klärung der Frage, ob das NNCS Einfluss auf die Expression der MZP in MZ nimmt, wurden murine peritoneale MZ aus Wt und $\alpha 7$ -KO Tieren isoliert und in der Kultur mit unterschiedlichen Mediatoren stimuliert (Tabelle 15).

Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Abwesenheit des nAChR $\alpha 7$ ohne zusätzliche Behandlung keinen Einfluss auf die Expression der MZP4 besitzt. Die Stimulation mit SP führte in den MZ ohne nAChR $\alpha 7$ zu einem tendenziellen Abfall der MZP4. Dies zeigte, dass nAChR $\alpha 7$ in die Stabilisierung der MZP4-Expression involviert ist. Hervorzuheben ist, dass dieser bereits beobachtete Trend zu einer signifikanten Reduktion führte, wenn SP mit SLURP1 kombiniert wurde. Der spezifische endogene nAChR $\alpha 7$ -Ligand verstärkte die MZP4-Expression und zeigte im nAChR $\alpha 7$ -defizienten Tier keinen Effekt. Für MZP6 konnte keine Regulation festgestellt werden (Abbildung 20).

Fügt man diese Ergebnisse mit den Proteindaten aus dem AID-Stress-Modell zusammen, fällt auf, dass der nAChR $\alpha 7$ -abhängige Mechanismus auf Proteinebene unter Stress oder AID stabilisierend auf die MZP4-Expression wirkt. Auch bei Aufeinandertreffen zweier Stressoren bleibt die Proteinexpression der MZP4 in MZ initial stabil und zeigt sich sogar erhöht (Abbildung 18 A).

Zusammengefasst könnte dies bedeuten, dass SP die MZP4-Expression in Gegenwart von nAChR $\alpha 7$ induziert. Es ist anzunehmen, dass die gleichzeitige Aktivierung von Stressantwort-regulierenden Rezeptoren (nAChR $\alpha 7$) zur Beendigung der entzündungsfördernden Rolle der MZ und neurogenen Entzündung durch Stabilisierung der MZP4-Expression beiträgt.

4.7.3 NGF-abhängige Blockade der Mastzellprotease 4 molekularer Ebene

Auf Basis der beschriebenen Ergebnisse wurde auf molekularer Ebene die Expression von MZP4 in der Vollhaut mittels qPCR bestimmt. Diese Ergebnisse können repräsentativ für die kutanen MZ interpretiert werden. Im Kontrast zu den Ergebnissen auf Proteinebene zeigte sich, dass MZP4 auf molekularer Ebene in der AID nicht reguliert wird. Kombinierte man Stress und AID kam es zu einer nahezu vollständigen Herunterregulation auf mRNA-Ebene. Dieser Effekt konnte durch Gabe eines NGF AK aufgehoben werden. Die Blockade von BDNF zeigte keinen Effekt.

Auffallend war, dass der Block von NGF zu einem Anstieg der MZP4 mRNA-Level führte und für diese Behandlung eine Besserung der AID gezeigt werden konnte [12]. Dieses Ergebnis deckt sich ebenfalls mit den in dieser Arbeit für die Analyse des NNCS in der Haut gezeigten Effekten. Weitergehende Untersuchungen sind nötig, um zugrunde liegende Mechanismen aufzudecken. Es ist denkbar, dass das unter Stress vermehrt anfallende NGF selbst zu einer Herunterregulation der MZP4-mRNA führt. Weiterhin ist es denkbar, dass der Einsatz des NGF-Blocks über anderweitige Mechanismen und Systeme, beispielsweise dem NNCS, in einer Besserung der AID resultiert. In der Folge würden die SP-Level sinken und eine Erholung der MZP4-Expression eintreten.

Zusammengefasst bedeuten die für MZP4 erhobenen Ergebnisse, dass Stress und AID zu einem Anstieg der MZP4 auf Proteinebene führen. Dieser ist im weitesten Sinne als gegenregulatorischer Versuch im Hinblick auf ansteigende SP-Level zu verstehen. Die auf molekularer Ebene erhobenen Ergebnisse verhalten sich gegenläufig. Es ist anzunehmen, dass die Mobilisierung der MZP4 auf Proteinebene erfolgt, gleichzeitig aber deren Synthese auf molekularer Ebene inhibiert wird. In der Folge kommt es zu einer verstärkten SP-Wirkung, eine Eingrenzung der Entzündung wird verhindert. Der protektive Einfluss der MZP4 durch Spaltung von SP bricht zusammen. Dieser Effekt scheint NGF-abhängig zu sein, da dessen Blockade die MZP4 mRNA-Level normalisiert. Interessanterweise scheint nAChR α 7 in diesen Prozess involviert zu sein.

4.7.4 Untergeordnete Rolle der Mastzellprotease 6 in der AID

Die in der Literatur beschriebenen Funktionen der MZP6 sind vielseitig, nur wenig ist bisher über ihre spezifische Rolle in der Haut bekannt. Jedoch konnte bereits in einem AID-Mausmodell gezeigt werden, dass die Stimulation von PAR2, einem spezifischen Tryptasen-Rezeptor, mittels spezifischer Agonisten in einer Verschlechterung der Entzündung resultiert. Als Ursache hierfür wird die durch PAR2-eingeleitete Abgabe von SP durch sensorische NF diskutiert [257].

Das bekannteste Leitsymptom der AD ist der Juckreiz. Für MZP6 konnte gezeigt werden, dass die Gabe von PAR2-Agonisten zu verstärktem Pruritus führt, die Gabe spezifischer Antagonisten hebt diesen auf. Dabei wird auch die Expression der PAR auf sensorischen NF diskutiert [258]. Diese Beobachtung konnte auch durch Steinhoff et al. in humanen Untersuchungen bestätigt werden [251]. Die MZP6 scheint also eine entscheidende Rolle in der Induktion und Aufrechterhaltung des Juckreizes einzunehmen. Diese Tatsache unterstützt die wichtige Rolle der MZ in der Genese der AD, da nur diese Quelle der MZP6 sein können [72, 243, 318].

Die Untersuchung der MZP6-Proteinexpression in MZ zeigte keine behandlungsabhängigen Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen. Auf molekularer Ebene konnte eine Herunterregulation in Stress oder AID nachgewiesen werden. Deren Kombination führte zu einem Anstieg der MZP6-Genexpression. Der Block von NGF zeigte keinen Effekt, jedoch führte der Block von BDNF zu einem deutlichen Anstieg der MZP6 mRNA-Level.

Die Interpretation der hier gezeigten Ergebnisse für MZP6 lässt keinen eindeutigen Schluss zu. Insbesondere die mangelnde Reaktivität der MZP6 auf Proteinebene spricht für eine untergeordnete Rolle im Rahmen der unmittelbaren Stress- und Entzündungsreaktion in der Haut (Abbildung 19). Die molekulare Analyse ergab reduzierte mRNA-Level unter Stress und in der AID. Hierbei könnte es sich möglicherweise um einen schützenden Mechanismus handeln, der durch Reduktion der mRNA-Level in diesen beiden Gruppen die o.g. genannten entzündungsförderlichen Prozesse gegenreguliert. Interessanterweise spiegelten sich diese Veränderungen nicht auf Proteinebene innerhalb der MZ wider, möglicherweise käme es aber im Verlauf zu einem Abfall der MZP6-Proteinexpression (Abbildung 21 B). Eine andere mögliche Ursache könnte eine verminderte biologische Stabilität und somit erschwerte immunhistochemische Detektion der MZP6 nach Sekretion oder die unmittelbare Interaktion der Tryptase mit NF in der Nähe der MZ sein [128, 319]. Bemerkenswert ist, dass die Kombination der Stressoren Entzündung und Lärm zu einem Anstieg der

mRNA-Level führte. Die oben beschriebenen Mechanismen könnten somit verstärkt werden und zur Verschlechterung der AID beitragen. Dieser Mechanismus scheint unter Kontrolle von BDNF zu stehen. Die Analyse der MZP6 im Rahmen der PMZK zeigte ein mit der Expression der MZP4 vergleichbares Muster, ergab jedoch keine signifikanten Veränderungen, weshalb von keinem relevanten Einfluss von nAChR α 7 auf die Expression der MZP6 auszugehen ist. MZP6 scheint insgesamt eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.7.5 Schlussfolgerung Mastzellproteasen

Insgesamt können die hier festgestellten Expressionsveränderungen der MZP, insbesondere MZP4, auf Proteinebene als Versuch verstanden werden, die Effekte von SP und die Verstärkung der neurogenen Entzündung einzudämmen. Im Verlauf kommt es zu einer NGF-abhängigen Inhibition dieses protektiven Mechanismus, in den auch nAChR α 7 involviert scheint. Dies steht im Einklang mit der Verschlechterung der AID unter Stress bei gleichzeitiger Zunahme SP+ NF und einer Zytokindysbalance [12, 13]. MZP könnten somit ein lohnendes Ziel zur Veränderung des neuropeptidergen Einflusses im Rahmen allergischer Erkrankungen und unter Stress sein.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Die zusammenfassende Betrachtung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigt, dass das kutane und in MZ vorhandene NNCS als neues in die Stressantwort involviertes System verstanden werden kann. Die Beobachtung, dass mentale Stressoren wie Lärm zu messbaren Veränderungen im neuroendokrinen System der Haut führen, konnte auch für das NNCS bestätigt werden.

Hierbei ist es möglich, dem NNCS unter Stress oder Entzündung eine schützende und stabilisierende Rolle für das Immunsystem zu attestieren. Kommt es zu einem gleichzeitigen Aufeinandertreffen der Stressoren, führt dies zu einer Hochregulation des NNCS und in der Folge zur Regulation dessen Zielstrukturen. Es kommt zu einer proallergischen Ausrichtung des Immunsystems. Das NNCS trägt unter diesen Umständen zur Verschlechterung allergischer Erkrankungen bei und unterstützt die postulierte Double-Hit-Hypothese als Ursache stressabhängiger Verschlechterungen chronischer Erkrankungen.

Auch die vielfach in der Literatur als protektiv diskutierten MZP können diesen Mechanismus, insbesondere die Aufrechterhaltung und Verschlimmerung der neurogenen Entzündung, trotz initialer Gegensteuerung nicht reduzieren. Sie tragen zur Verschlechterung der AID unter Stress bei. Die Stabilisierung der MZP, in erster Linie MZP4, könnte jedoch als potenzieller Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen dienen.

Die Relevanz der in diesen Prozess involvierten NT, insbesondere NGF, konnte durch Verbesserung der AID nach Blockade von NGF nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten auch auf das NNCS übertragen werden und spiegeln sich auch in der ansteigenden Expression der protektiven MZP4 nach NGF-Blockade wider.

In den vergangenen Jahren rückte die Erforschung des NNCS in unterschiedlichen Organen zunehmend in den Fokus der Wissenschaft und offenbarte dessen Beteiligung an der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Erkrankungen. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen erstmals, dass das kutane NNCS durch Stress und Entzündung beeinflusst wird.

In den kommenden Jahren wird es nötig sein, die grundlegenden Mechanismen des NNCS zu verstehen und diese Analysen auf neue in die Pathogenese der AD involvierte Zellen, wie den TH17-Zellen oder regulatorischer T-Zellen, auszuweiten. Nur so kann ein umfassendes Verständnis erlangt werden.

5 Zusammenfassung

Die Haut wird mit unterschiedlichen exogenen und endogenen Herausforderungen konfrontiert. Die Anpassung an diese stellt sie vor eine besondere Aufgaben und scheint zusätzlich ein besonderes Merkmal des cholinergen Systems zu sein. Wesentliche in die Stressantwort der Haut involvierte Systeme sind bekannt, aber auch Acetylcholin scheint in der Regulierung von Entzündungen und Erkrankungen der Haut von entscheidender Bedeutung zu sein. Es ist deshalb von großer Bedeutung, die Rolle der Stresswahrnehmung und die folgende Aktivierung des non-neuronalen cholinergen Systems (NNCS) in der Haut im Hinblick auf unterschiedliche Stressoren zu verstehen. Grundlage der hier durchgeführten Microarray-, HPLC-, qPCR- und Immunhistochemie-Untersuchungen bildete ein etabliertes murines Tiermodell, das sog. Atopische Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis (AID)-Stress-Modell und kultivierte murine peritoneale Mastzellen (MZ). Der Microarray gestresster und nicht-gestresster Haut offenbarte ein spezifisches Expressionsmuster der Zytokine und deren Rezeptoren, welches möglicherweise durch nikotinerge und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren beeinflusst wird. Die molekulare Analyse relevanter NNCS-Marker, mit diesen assoziierter Zytokine und Zytokinrezeptoren und die Messung der Acetylcholin-Konzentration in muriner Vollhaut zeigte, dass das NNCS im Rahmen der AID eine protektive, antiallergische Stellung einnimmt. Zusätzlicher Stress in der AID lies diesen schützenden Mechanismus zusammenbrechen und resultierte in einer proallergischen Ausrichtung des NNCS. Mit der Immunhistochemie konnten MZ dem kutanen NNCS zugeordnet werden. Gleichzeitig spiegelten sich die bereits für die Vollhaut auf molekularer Ebene beobachteten Effekte auf Basis der MZ wider. Auch die im Rahmen der neurogenen Entzündung initial schützende Mastzellprotease (MZP) 4 wird bei Aufeinandertreffen beider Stressoren auf molekularer Ebene abgeschaltet und fördert im Verlauf die Verstärkung der Entzündung. Hierbei konnte im Rahmen der Mastzellkultur nachgewiesen werden, dass der nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor Alpha 7 in die Substanz P-abhängige Induktion der MZP-Expression involviert ist. Die zusätzliche Blockade des Neurotrophins Nerve Growth Factor reduzierte die vermehrte Aktivierung des NNCS auf molekularer Ebene und Proteinbasis und bestätigte bereits beschriebene entzündungshemmende Effekte im Rahmen der AID. Diese Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass das NNCS eine Schlüsselrolle in der Steuerung von stressempfindlichen entzündlichen Reaktionen der Haut, insbesondere in MZ, übernimmt. Weitere Studien sind nötig, um die grundlegenden molekularen Mechanismen zu verstehen und potenzielle pharmakologische Ansätze für die Therapie zu finden, wie unter anderem die vielversprechenden MZP.

6 Summary

The skin is confronted with different exogenous and endogenous challenges. Adaptation to these challenges appears to be a distinct feature of the cholinergic system. Intrinsically acting stress-cascades are well known in skin, in which acetylcholine (ACh) may play a key role in the regulation of cutaneous inflammation and disease. Thus it is vital to address the role of stress perception and subsequent non-neuronal cholinergic system (NNCS) activation in response to different kinds of stressors. Basis of the here presented microarray-, HPLC-, qPCR- and immunohistochemistry investigations was an established murine animal model, the atopic dermatitis-like allergic dermatitis (AID)-stress-model, and cultured murine peritoneal mast cells (PMCC). Microarray analysis of stressed and unstressed skin revealed a specific expression pattern of cytokines and their receptors, which may be affected by nicotinic and muscarinic receptors. Molecular analysis of relevant NNCS-markers, associated cytokines and cytokine receptors and measurement of ACh concentration in murine full thickness back skin showed, that the NNCS holds a protective, anti-allergic role in AID. Additional stress breaks down this protective mechanism and results in a pro-allergic orientation of the NNCS. By immunohistochemistry MCs could be identified as part of the cutaneous NNCS. In addition, MC investigations showed a same tendency as molecular results of full thickness back skin. Also mast cell protease (MCP) 4, having a protective role in neurogenic inflammation, is downregulated on molecular level, if both stressors are applied and supports worsening of inflammation. At this, PMCC investigations demonstrated involvement of nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 in a substance P-dependent MCP-expression. Additional blocking of the neurotrophin nerve growth factor in AID-stress-model reduced increased activation of the NNCS at mRNA and protein levels and confirmed anti-inflammatory effects in stress-worsened AID which is very well described in literature.

These data conclude that the NNCS plays a key role in the regulation of stress-sensitive inflammatory responses in skin, especially in MCs. Further studies are necessary to understand the fundamental molecular mechanisms and to find pharmacological approaches for therapy, utilizing the potential of MCPs.

Abkürzungsverzeichnis

+	wenn an Marker angefügt z.B. ChAT+ = Marker positiv
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholin-Rezeptor/en
AD	Atopische Dermatitis
AK	Antikörper
AID	Atopischer Dermatitis-ähnliche allergische Dermatitis (engl. atopic-like dermatitis allergic dermatitis)
AMP	antimikrobielle Peptide
APC	antigen-presenting cell (dt. Antigen-präsentierende Zelle)
BChE	Butyrylcholinesterase
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CD	cluster of differentiation
CGRP	calcitonin gene-related peptide
ChAT	Acetylcholintransferase (engl. choline acetyltransferase)
CPA	Carboxypeptidase A
CRH	corticotropin-releasing hormone
CS	cholinerges System
CTMCs	connective tissue mast cells
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylidicarbonat
DZ	dendritische Zelle/n
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FcεRI	hochaffiner IgE-bindender Rezeptor
FITC-Avidin	Fluoresceinisothiocyanat-Avidin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IF	Immunfluoreszenz
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IL-10RB	IL-10 Rezeptor Beta
IL-1R	IL-1 Rezeptor

LHZ	Langerhans-Zelle/n
m3-KO	mAChR3-Knockout
mAChR	muskarinerge/r Acetylcholin-Rezeptor/en
Min.	Minute/n
MMCs	mucosa mast cells
MZ	Mastzelle/n
MZP	Mastzellprotease/n
nAChR	nikotinerge/r Acetylcholin-Rezeptor/en
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF	Nervenfaser/n
NGF	nerve growth factor
NKR	Neurokinin-Rezeptoren
NKZ	natürliche Killerzelle/n
NNCS	non-neuronales cholinerges System
NP	Neuropeptid/e
NT	Neurotrophin/e
NTR	Neurotrophin-Rezeptor/en
OT	Objektträger
PARs	proteinase-activated receptors
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PMZK	peritoneale Mastzellkultur
PRRs	pattern-recognition receptors
qPCR	quantitative Polymeraseketten-Reaktion
RT	Raumtemperatur
SA	Sympathische Achse
SCF	stem cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde/n
SLURP	secreted Ly-6/uPAR-related protein
SP	Substanz P
Std.	Stunde/n
TBS	Tris-gepufferte Saline
TGF- β	transforming growth factor β
TH	T-Helferzelle/n

TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor/en
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trk	Tyrosin-Kinase-Rezeptor/n
U/Min.	Umdrehungen pro Minute
VACht	vesikulärer Acetylcholintransporter
Wt	Wildtyp
α 7-KO	nAChR α 7-Knockout

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Diagnosekriterien der Atopischen Dermatitis	16
Tabelle 2 Einteilung humaner und muriner Mastzellproteasen (nach [26])	21
Tabelle 3 Liste der verwendeten Instrumente	27
Tabelle 4 Liste der verwendeten Labormaterialien	28
Tabelle 5 Liste der verwendeten Chemikalien und Reagenzien	29
Tabelle 6 Liste der verwendeten Kits	30
Tabelle 7 Liste der hergestellten Medien	31
Tabelle 8 Liste der hergestellten Puffer und Lösungen	31
Tabelle 9 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten primären Antikörper	32
Tabelle 10 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten sekundären Antikörper...	33
Tabelle 11 Liste der in der Immunfluoreszenz verwendeten Blockpeptide	33
Tabelle 12 Liste der in der qPCR verwendeten Primer und Sonden	34
Tabelle 13 Liste der verwendeten Software	35
Tabelle 14 Behandlungsgruppen im AID-Stress-Modell.....	36
Tabelle 15 In der peritonealen Mastzellkultur verwendete Substanzen	42
Tabelle 16 Behandlungsgruppen in der peritonealen Mastzellkultur.....	42
Tabelle 17 Zusammensetzung des cDNA-Reaktionsgemisches	46
Tabelle 18 Thermocycler-Profil der durchgeführten qPCR	46
Tabelle 19 Zusammenfassung der wichtigsten Microarray-Ergebnisse	50
Tabelle 20 Übersicht der qPCR- und HPLC-Ergebnisse des kutanen NNCS	79
Tabelle 21 Übersicht der qPCR Ergebnisse der TH1- und TH2-Zytokine und derer Rezeptoren	83
Tabelle 22 Übersicht der qPCR- und HPLC-Ergebnisse nach anti-NGF oder anti-BDNF Behandlung.....	87
Tabelle 23 Übersicht der immunhistochemischen Ergebnisse in Mastzellen.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Epidermis (modifiziert nach [122])	8
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Mastzellaktivierung und sezernierter Mediatoren	20
Abbildung 3 Rolle der Mastzellen in der neurogenen Entzündung	23
Abbildung 4 Schematische Darstellung des AID-Stress-Modells	37
Abbildung 5 Histochemische und immunhistochemische Markierung kultivierter Mastzellen.....	41
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Microarray-Analyse	52
Abbildung 7 qPCR Analyse der Schlüsselspieler des Acetylcholin-Stoffwechsels in muriner Vollhaut.....	54
Abbildung 8 qPCR Analyse von nAChR α 7 und mAChR3 in muriner Vollhaut.....	55
Abbildung 9 qPCR Analyse der SLURP1 Expression in muriner Vollhaut	57
Abbildung 10 Bestimmung der ACh- und Cholin-Konzentration in muriner Vollhaut mittels HPLC	58
Abbildung 11 qPCR Analyse der Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine in muriner Vollhaut.....	60
Abbildung 12 qPCR Analyse der Expression NNCS-assoziiertes Zytokinrezeptoren in muriner Vollhaut.....	61
Abbildung 13 Immunhistochemischer Nachweis der NNCS-Proteine in Mastzellen	64
Abbildung 14 Histochemische Analyse der ChAT-Expression in kutanen Mastzellen .	66
Abbildung 15 Histochemische Analyse der nAChR α 7-Expression in kutanen Mastzellen	67
Abbildung 16 Histochemischer Nachweis der TH1- und TH2-Zytokine in Mastzellen .	68
Abbildung 17 Histochemische Analyse der Expression der TH1- und TH2-spezifischen Zytokine in Mastzellen	70
Abbildung 18 Histochemische Analyse der MZP4 Expression in kutanen Mastzellen .	72
Abbildung 19 Histochemische Analyse der MZP6 Expression in kutanen Mastzellen .	73

Abbildung 20 qPCR Analyse der MZP4- und MZP6-Expression in peritonealen Mastzellen.....	75
Abbildung 21 qPCR Analyse der Expression von MZP4 und MZP6 in muriner Vollhaut	76
Abbildung 22 IL-10/TNF α Quotient.....	84

Literaturverzeichnis

1. Schneiderman, N., G. Ironson, and S.D. Siegel, *Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants*. Annu Rev Clin Psychol, 2005. **1**: p. 607-28.
2. McEwen, B.S., *Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain*. Dialogues Clin Neurosci, 2006. **8**(4): p. 367-81.
3. McEwen, B.S., *Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1032**: p. 1-7.
4. Segerstrom, S.C. and G.E. Miller, *Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry*. Psychol Bull, 2004. **130**(4): p. 601-30.
5. Dhabhar, F.S., *Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2008. **4**(1): p. 2-11.
6. Dhabhar, F.S., *Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin*. Clin Dermatol, 2013. **31**(1): p. 18-30.
7. English, J.S., R.S. Dawe, and J. Ferguson, *Environmental effects and skin disease*. Br Med Bull, 2003. **68**: p. 129-42.
8. Peters, E.M., et al., *Mental stress in atopic dermatitis - neuronal plasticity and the cholinergic system are affected in atopic dermatitis and in response to acute experimental mental stress in a randomized controlled pilot study*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113552.
9. Arck, P.C., et al., *Neuroimmunology of stress: skin takes center stage*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p. 1697-704.
10. Peters, E.M., et al., *Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease*. Horm Metab Res, 2007. **39**(2): p. 110-24.
11. Kodama, A., et al., *Effect of stress on atopic dermatitis: investigation in patients after the great hanshin earthquake*. J Allergy Clin Immunol, 1999. **104**(1): p. 173-6.
12. Peters, E.M., et al., *Nerve growth factor partially recovers inflamed skin from stress-induced worsening in allergic inflammation*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(3): p. 735-43.
13. Pavlovic, S., et al., *Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(2): p. 434-46.
14. Buske-Kirschbaum, A., M. Ebrecht, and D.H. Hellhammer, *Blunted HPA axis responsiveness to stress in atopic patients is associated with the acuity and severeness of allergic inflammation*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(8): p. 1347-53.
15. Hall, J.M., et al., *Psychological Stress and the Cutaneous Immune Response: Roles of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Atopic Dermatitis and Psoriasis*. Dermatol Res Pract, 2012. **2012**: p. 403908.
16. Buske-Kirschbaum, A., et al., *Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(9): p. 4245-51.
17. Buske-Kirschbaum, A., S. Jobst, and D.H. Hellhammer, *Altered reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in patients with atopic dermatitis: pathologic factor or symptom?* Ann N Y Acad Sci, 1998. **840**: p. 747-54.
18. Buske-Kirschbaum, A., A. Geiben, and D. Hellhammer, *Psychobiological aspects of atopic dermatitis: an overview*. Psychother Psychosom, 2001. **70**(1): p. 6-16.
19. Buske-Kirschbaum, A. and D.H. Hellhammer, *Endocrine and immune responses to stress in chronic inflammatory skin disorders*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **992**: p. 231-40.

20. Singh, L.K., et al., *Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders*. Brain, behavior, and immunity, 1999. **13**(3): p. 225-39.
21. Lugovic-Mihic, L., et al., *Psychoneuroimmunologic aspects of skin diseases*. Acta Clin Croat, 2013. **52**(3): p. 337-45.
22. Senra, M.S. and A. Wollenberg, *Psychodermatological aspects of atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 2014. **170** Suppl 1: p. 38-43.
23. Grando, S.A., et al., *Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine*. J Invest Dermatol, 1993. **101**(1): p. 32-6.
24. Kalesnikoff, J. and S.J. Galli, *Antiinflammatory and immunosuppressive functions of mast cells*. Methods Mol Biol, 2011. **677**: p. 207-20.
25. Theoharides, T.C., et al., *Mast cells and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(1): p. 21-33.
26. Pejler, G., et al., *Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4981-90.
27. Caughey, G.H., et al., *Substance P and vasoactive intestinal peptide degradation by mast cell tryptase and chymase*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **244**(1): p. 133-7.
28. Caughey, G.H., *Mast cell proteases as protective and inflammatory mediators*. Advances in experimental medicine and biology, 2011. **716**: p. 212-34.
29. Groneberg, D.A., et al., *Gene expression and regulation of nerve growth factor in atopic dermatitis mast cells and the human mast cell line-1*. J Neuroimmunol, 2005. **161**(1-2): p. 87-92.
30. Kawakami, T., et al., *Mast cells in atopic dermatitis*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 666-78.
31. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai, *Mast cells in the development of adaptive immune responses*. Nature immunology, 2005. **6**(2): p. 135-42.
32. Tsai, M., M. Grimaldeston, and S.J. Galli, *Mast cells and immunoregulation/immunomodulation*. Advances in experimental medicine and biology, 2011. **716**: p. 186-211.
33. Bernard, C., *Recherches expérimentales sur le grand sympathique, et spécialement sur l'influence que la section de ce nerf exerce sur la chaleur animale lues à la Société de biologie, dans les séances des 7 et 21 décembre 1853*. 1854, Paris: impr. de E. Thunot et Cie. 35.
34. Bernard, C., P. Bert, and A. Dastre, *Leçons sur les phénomènes de la vie, communs aux animaux et aux végétaux publié par A. Dastre*. 1878, Paris: J.-B. Baillière et fils. 2 vol.
35. Cannon, W.B., *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement*. 1915, New York, London,: D. Appleton and Company. xiii, 311 p.
36. Euler, U.S., *Assay of noradrenalin and adrenalin in extracts of nerves and tissues*. Nature, 1948. **162**(4119): p. 570.
37. Patel, J.N., et al., *Norepinephrine spillover from human adipose tissue before and after a 72-hour fast*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3373-7.
38. Gerra, G., et al., *Neuroendocrine responses to experimentally-induced psychological stress in healthy humans*. Psychoneuroendocrinology, 2001. **26**(1): p. 91-107.
39. Cannon, W.B., *The wisdom of the body*. 1932, New York,: W.W. Norton & Company. xv p., 1 l., 19-312 p.
40. Selye, H. and A. Horava, *Stress*. Tidsskr Nor Laegeforen, 1953. **73**(5): p. 195.
41. Selye, H., *Stress and the general adaptation syndrome*. Br Med J, 1950. **1**(4667): p. 1383-92.

42. Selye, H., *A syndrome produced by diverse noxious agents*. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1998. **10**(2): p. 230-1.
43. Selye, H., *The evolution of the stress concept*. *Am Sci*, 1973. **61**(6): p. 692-9.
44. Chrousos, G.P. and P.W. Gold, *The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis*. *JAMA*, 1992. **267**(9): p. 1244-52.
45. McEwen, B.S., *Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load*. *Ann N Y Acad Sci*, 1998. **840**: p. 33-44.
46. Sterling, P., *Allostasis: a model of predictive regulation*. *Physiol Behav*, 2012. **106**(1): p. 5-15.
47. Sterling, P., *Homeostasis vs allostasis: implications for brain function and mental disorders*. *JAMA Psychiatry*, 2014. **71**(10): p. 1192-3.
48. Jurkiewicz, B.A., D.L. Bissett, and G.R. Buettner, *Effect of topically applied tocopherol on ultraviolet radiation-mediated free radical damage in skin*. *J Invest Dermatol*, 1995. **104**(4): p. 484-8.
49. Tyrrell, R.M., *Ultraviolet radiation and free radical damage to skin*. *Biochem Soc Symp*, 1995. **61**: p. 47-53.
50. Goossens, R.A., *Allergic contact dermatitis from the vehicle components of topical pharmaceutical products*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2014. **34**(3): p. 663-70, ix-x.
51. Sanders, J.E., B.S. Goldstein, and D.F. Leotta, *Skin response to mechanical stress: adaptation rather than breakdown--a review of the literature*. *J Rehabil Res Dev*, 1995. **32**(3): p. 214-26.
52. Gupta, M.A. and A.K. Gupta, *Depression and suicidal ideation in dermatology patients with acne, alopecia areata, atopic dermatitis and psoriasis*. *Br J Dermatol*, 1998. **139**(5): p. 846-50.
53. Slattery, M.J., et al., *Depression, anxiety, and dermatologic quality of life in adolescents with atopic dermatitis*. *J Allergy Clin Immunol*, 2011. **128**(3): p. 668-71.
54. Dhabhar, F.S. and B.S. McEwen, *Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking*. *Brain Behav Immun*, 1997. **11**(4): p. 286-306.
55. Dhabhar, F.S., *Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful*. *Immunol Res*, 2014. **58**(2-3): p. 193-210.
56. Gilad, G.M., et al., *Stress-induced activation of the hippocampal cholinergic system and the pituitary-adrenocortical axis*. *Brain Res*, 1985. **347**(2): p. 404-8.
57. Steinhoff, M., et al., *Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation*. *Arch Dermatol*, 2003. **139**(11): p. 1479-88.
58. Cevikbas, F., et al., *Neuroimmune interactions in allergic skin diseases*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2007. **7**(5): p. 365-73.
59. Gilbey, M.P. and K.M. Spyer, *Essential organization of the sympathetic nervous system*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1993. **7**(2): p. 259-78.
60. Elenkov, I.J., et al., *The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(4): p. 595-638.
61. Vale, W., et al., *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin*. *Science*, 1981. **213**(4514): p. 1394-7.
62. Rivier, C. and W. Vale, *Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin*. *Nature*, 1983. **305**(5932): p. 325-7.

63. Cao, J., et al., *Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor.* J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7665-75.
64. Slominski, A., et al., *Cutaneous expression of corticotropin-releasing hormone (CRH), urocortin, and CRH receptors.* FASEB J, 2001. **15**(10): p. 1678-93.
65. McEwen, B.S. and E. Stellar, *Stress and the individual. Mechanisms leading to disease.* Arch Intern Med, 1993. **153**(18): p. 2093-101.
66. Vreeburg, S.A., et al., *Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study.* Arch Gen Psychiatry, 2009. **66**(6): p. 617-26.
67. Ishay, A., et al., *Suppression of the HPA axis in pediatric patients with atopic dermatitis.* Arch Dermatol, 2007. **143**(11): p. 1449-50.
68. Toyoda, M., et al., *Immunolocalization of substance P in human skin mast cells.* Arch Dermatol Res, 2000. **292**(8): p. 418-21.
69. Schulze, E., et al., *Immunohistochemical detection of human skin nerve fibers.* Acta Histochem, 1997. **99**(3): p. 301-9.
70. van der Kleij, H.P., et al., *Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor.* J Immunol, 2003. **171**(4): p. 2074-9.
71. Forsythe, P. and J. Bienenstock, *The mast cell-nerve functional unit: a key component of physiologic and pathophysiologic responses.* Chem Immunol Allergy, 2012. **98**: p. 196-221.
72. Bauer, O. and E. Razin, *Mast Cell-Nerve Interactions.* News Physiol Sci, 2000. **15**: p. 213-218.
73. V. Euler, U. and J.H. Gaddum, *An unidentified depressor substance in certain tissue extracts.* J Physiol, 1931. **72**(1): p. 74-87.
74. Liu, J.Y., et al., *Substance P receptor expression in human skin keratinocytes and fibroblasts.* Br J Dermatol, 2006. **155**(4): p. 657-62.
75. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, *Physiology of the neurotrophins.* Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 289-317.
76. Nilsson, A.S., et al., *Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish.* FEBS Lett, 1998. **424**(3): p. 285-90.
77. Gotz, R., et al., *Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family.* Nature, 1994. **372**(6503): p. 266-9.
78. Maisonpierre, P.C., et al., *Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF.* Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1446-51.
79. Hallbook, F., C.F. Ibanez, and H. Persson, *Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in Xenopus ovary.* Neuron, 1991. **6**(5): p. 845-58.
80. Cohen, S., R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, *A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1954. **40**(10): p. 1014-8.
81. Patapoutian, A. and L.F. Reichardt, *Trk receptors: mediators of neurotrophin action.* Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 272-80.
82. Conover, J.C. and G.D. Yancopoulos, *Neurotrophin regulation of the developing nervous system: analyses of knockout mice.* Rev Neurosci, 1997. **8**(1): p. 13-27.
83. Bibel, M., E. Hoppe, and Y.A. Barde, *Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR.* EMBO J, 1999. **18**(3): p. 616-22.
84. Raap, U. and A. Kapp, *Neurotrophins in healthy and diseased skin.* G Ital Dermatol Venereol, 2010. **145**(2): p. 205-11.

85. Dou, Y.C., et al., *Increased nerve growth factor and its receptors in atopic dermatitis: an immunohistochemical study*. Arch Dermatol Res, 2006. **298**(1): p. 31-7.
86. Levi-Montalcini, R., *The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells*. Harvey Lect, 1966. **60**: p. 217-59.
87. Botchkarev, V.A., et al., *Neurotrophins in skin biology and pathology*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p. 1719-27.
88. Tirassa, P., et al., *RT-PCR ELISA method for the analysis of neurotrophin mRNA expression in brain and peripheral tissues*. J Biotechnol, 2000. **84**(3): p. 259-72.
89. Barde, Y.A., D. Edgar, and H. Thoenen, *Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain*. EMBO J, 1982. **1**(5): p. 549-53.
90. Jones, K.R., et al., *Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development*. Cell, 1994. **76**(6): p. 989-99.
91. Groneberg, D.A., et al., *Cell type-specific regulation of brain-derived neurotrophic factor in states of allergic inflammation*. Clin Exp Allergy, 2007. **37**(9): p. 1386-91.
92. Rosenfeld, R.D., et al., *Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum*. Protein Expr Purif, 1995. **6**(4): p. 465-71.
93. Pincelli, C. and A. Marconi, *Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes*. J Dermatol Sci, 2000. **22**(2): p. 71-9.
94. Leon, A., et al., *Mast cells synthesize, store, and release nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 3739-43.
95. Huang, E.J. and L.F. Reichardt, *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 677-736.
96. Farinas, I., *Neurotrophin actions during the development of the peripheral nervous system*. Microsc Res Tech, 1999. **45**(4-5): p. 233-42.
97. Sariola, H., *The neurotrophic factors in non-neuronal tissues*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(8): p. 1061-6.
98. Raap, U., et al., *Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1268-75.
99. Scuri, M., L. Samsell, and G. Piedimonte, *The role of neurotrophins in inflammation and allergy*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010. **9**(3): p. 173-80.
100. Arredondo, J., et al., *SLURP-2: A novel cholinergic signaling peptide in human mucocutaneous epithelium*. J Cell Physiol, 2006. **208**(1): p. 238-45.
101. Horiguchi, K., et al., *Expression of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells*. J Neurosci Res, 2009. **87**(12): p. 2740-7.
102. Sudheer, P.S., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors on basophils and mast cells*. Anaesthesia, 2006. **61**(12): p. 1170-4.
103. Grando, S.A., *Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors*. J Investig Dermatol Symp Proc, 1997. **2**(1): p. 41-8.
104. Wessler, I. and C.J. Kirkpatrick, *Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(8): p. 1558-71.
105. Moriwaki, Y., et al., *Immune system expression of SLURP-1 and SLURP-2, two endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligands*. Life Sci, 2007. **80**(24-25): p. 2365-8.
106. Arredondo, J., et al., *Biological effects of SLURP-1 on human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(6): p. 1236-41.

107. Wessler, I., et al., *The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(1): p. 2-10.
108. Wessler, I., C.J. Kirkpatrick, and K. Racke, *The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1999. **26**(3): p. 198-205.
109. Wessler, I., C.J. Kirkpatrick, and K. Racke, *Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans*. Pharmacol Ther, 1998. **77**(1): p. 59-79.
110. Chernyavsky, A.I., et al., *Anti-Inflammatory Effects of the Nicotinic Peptides SLURP-1 and SLURP-2 on Human Intestinal Epithelial Cells and Immunocytes*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 609086.
111. Chernyavsky, A.I., et al., *Auto/paracrine nicotinic peptides participate in cutaneous stress response to wounding*. Dermatoendocrinol, 2012. **4**(3): p. 324-30.
112. Chimienti, F., et al., *Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(22): p. 3017-24.
113. Li, Y., et al., *Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons*. J Neurosci, 1995. **15**(4): p. 2888-905.
114. Kummer, W., et al., *Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse*. Respir Res, 2006. **7**: p. 65.
115. Lips, K.S., et al., *Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium*. Eur Urol, 2007. **51**(4): p. 1042-53.
116. Wessler, I., et al., *Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(5): p. 951-6.
117. Israel, M. and Y. Dunant, *Mediatophore, a protein supporting quantal acetylcholine release*. Can J Physiol Pharmacol, 1999. **77**(9): p. 689-98.
118. Zerbib, R. and H. Laborit, *Chronic stress and memory: implication of the central cholinergic system*. Pharmacol Biochem Behav, 1990. **36**(4): p. 897-900.
119. Day, J.C., et al., *Prenatal stress enhances stress- and corticotropin-releasing factor-induced stimulation of hippocampal acetylcholine release in adult rats*. J Neurosci, 1998. **18**(5): p. 1886-92.
120. Saunders, P.R., N.P. Hanssen, and M.H. Perdue, *Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G486-90.
121. Pan, Z., et al., *M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptor promotes cardioprotection via the suppression of miR-376b-5p*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32571.
122. Benninghoff, A. and D. Drenckhahn, *Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Anatomie. 2004. p. XII, 876 S.
123. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollst. überarb. Aufl. ed. 2012*, Stuttgart u.a.: Thieme. XVII, 680 S.
124. Augustin, M., *Dermatologie. 7., komplett überarb. und erw. Aufl. ed. Duale Reihe, ed. I. Moll. 2010*, Stuttgart: Thieme.
125. Bienenstock, J., et al., *The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987. **82**(3-4): p. 238-43.
126. Kleij, H.P. and J. Bienenstock, *Significance of Conversation between Mast Cells and Nerves*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2005. **1**(2): p. 65-80.
127. Black, P.H., *Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation*. Brain Behav Immun, 2002. **16**(6): p. 622-53.

128. Peters, E.M., et al., *Stress exposure modulates peptidergic innervation and degranulates mast cells in murine skin*. Brain Behav Immun, 2005. **19**(3): p. 252-62.
129. Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. J Invest Dermatol, 1983. **80**(1 Suppl): p. 44s-9s.
130. Bibel, D.J., et al., *Antimicrobial activity of stratum corneum lipids from normal and essential fatty acid-deficient mice*. J Invest Dermatol, 1989. **92**(4): p. 632-8.
131. Jensen, J.M., et al., *Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in tinea corporis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(7): p. 1720-7.
132. Aberg, K.M., et al., *Co-regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability and antimicrobial barriers*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(4): p. 917-25.
133. Salmon, J.K., C.A. Armstrong, and J.C. Ansel, *The skin as an immune organ*. West J Med, 1994. **160**(2): p. 146-52.
134. Grone, A., *Keratinocytes and cytokines*. Vet Immunol Immunopathol, 2002. **88**(1-2): p. 1-12.
135. Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg, *The skin immune system: progress in cutaneous biology*. Immunol Today, 1993. **14**(2): p. 75-8.
136. Bos, J.D. and M.L. Kapsenberg, *The skin immune system Its cellular constituents and their interactions*. Immunol Today, 1986. **7**(7-8): p. 235-40.
137. Mrabet-Dahbi, S., et al., *Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands*. Exp Dermatol, 2009. **18**(5): p. 437-44.
138. Kollisch, G., et al., *Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes*. Immunology, 2005. **114**(4): p. 531-41.
139. Weaver, C.T., et al., *IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 821-52.
140. Kupper, T.S., *The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses*. J Invest Dermatol, 1990. **94**(6 Suppl): p. 146S-150S.
141. Enk, A.H. and S.I. Katz, *Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10*. J Immunol, 1992. **149**(1): p. 92-5.
142. Rivas, J.M. and S.E. Ullrich, *Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 3865-71.
143. Byun, J.Y., et al., *Expression of IL-10, TGF-beta(1) and TNF-alpha in Cultured Keratinocytes (HaCaT Cells) after IPL Treatment or ALA-IPL Photodynamic Treatment*. Ann Dermatol, 2009. **21**(1): p. 12-7.
144. Albanesi, C., et al., *Keratinocytes in inflammatory skin diseases*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(3): p. 329-34.
145. Barker, J.N., et al., *Keratinocytes as initiators of inflammation*. Lancet, 1991. **337**(8735): p. 211-4.
146. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
147. Babior, B.M., J.D. Lambeth, and W. Nauseef, *The neutrophil NADPH oxidase*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 342-4.
148. Lowin, B., M.C. Peitsch, and J. Tschopp, *Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **198**: p. 1-24.

149. Clark, R.A., *Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 362-70.
150. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
151. Schlaak, J.F., et al., *T cells involved in psoriasis vulgaris belong to the Th1 subset*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(2): p. 145-9.
152. Rush, J.S. and P.D. Hodgkin, *B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division, survival and differentiation*. Eur J Immunol, 2001. **31**(4): p. 1150-9.
153. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells*. J Immunol, 1991. **146**(10): p. 3444-51.
154. Koga, C., et al., *Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(11): p. 2625-30.
155. Eyerich, S., et al., *Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
156. Gittler, J.K., et al., *Progressive activation of T(H)2/T(H)22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **130**(6): p. 1344-54.
157. Agrawal, R., J.A. Wisniewski, and J.A. Woodfolk, *The role of regulatory T cells in atopic dermatitis*. Curr Probl Dermatol, 2011. **41**: p. 112-24.
158. Elenkov, I.J. and G.P. Chrousos, *Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 1999. **10**(9): p. 359-368.
159. Moalem, G., et al., *Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity*. J Autoimmun, 2000. **15**(3): p. 331-45.
160. De Rosa, M.J., et al., *Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation*. Life Sci, 2009. **85**(11-12): p. 444-9.
161. Lai, J.P., S.D. Douglas, and W.Z. Ho, *Human lymphocytes express substance P and its receptor*. J Neuroimmunol, 1998. **86**(1): p. 80-6.
162. Suzuki, H., et al., *Substance P induces degranulation of mast cells and leukocyte adhesion to venular endothelium*. Peptides, 1995. **16**(8): p. 1447-52.
163. Torcia, M., et al., *Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes*. Cell, 1996. **85**(3): p. 345-56.
164. Arndt, J., N. Smith, and F. Tausk, *Stress and atopic dermatitis*. Curr Allergy Asthma Rep, 2008. **8**(4): p. 312-7.
165. Chernyavsky, A.I., et al., *Novel cholinergic peptides SLURP-1 and -2 regulate epithelialization of cutaneous and oral wounds*. Wound Repair Regen, 2012. **20**(1): p. 103-13.
166. Kurzen, H., et al., *The non-neuronal cholinergic system of human skin*. Horm Metab Res, 2007. **39**(2): p. 125-35.
167. Grando, S.A., K. Kawashima, and I. Wessler, *Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans*. Life Sci, 2003. **72**(18-19): p. 2009-12.
168. Kindt, F., et al., *Reduced expression of nicotinic alpha subunits 3, 7, 9 and 10 in lesional and nonlesional atopic dermatitis skin but enhanced expression of alpha subunits 3 and 5 in mast cells*. Br J Dermatol, 2008. **159**(4): p. 847-57.
169. Grando, S.A., *Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors*. J Pharmacol Sci, 2008. **106**(2): p. 174-9.

170. Kawashima, K. and T. Fujii, *Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 2063-85.
171. Rinner, I., K. Kawashima, and K. Schauenstein, *Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation*. J Neuroimmunol, 1998. **81**(1-2): p. 31-7.
172. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-8.
173. Okuma, Y. and Y. Nomura, *Roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(1): p. 16-9.
174. Nizri, E., et al., *Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6681-8.
175. Bieber, T., *Atopic dermatitis*. Ann Dermatol, 2010. **22**(2): p. 125-37.
176. Grize, L., et al., *Trends in prevalence of asthma, allergic rhinitis and atopic dermatitis in 5-7-year old Swiss children from 1992 to 2001*. Allergy, 2006. **61**(5): p. 556-62.
177. Schultz Larsen, F., T. Diepgen, and A. Svensson, *The occurrence of atopic dermatitis in north Europe: an international questionnaire study*. J Am Acad Dermatol, 1996. **34**(5 Pt 1): p. 760-4.
178. Williams, H.C., *Is the prevalence of atopic dermatitis increasing?* Clin Exp Dermatol, 1992. **17**(6): p. 385-91.
179. Asher, M.I., et al., *Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 733-43.
180. Choi, W.J., et al., *Prevalence and risk factors for atopic dermatitis: a cross-sectional study of 6,453 Korean preschool children*. Acta Derm Venereol, 2012. **92**(5): p. 467-71.
181. Hanifin, J.M., et al., *Guidelines of care for atopic dermatitis, developed in accordance with the American Academy of Dermatology (AAD)/American Academy of Dermatology Association "Administrative Regulations for Evidence-Based Clinical Practice Guidelines"*. J Am Acad Dermatol, 2004. **50**(3): p. 391-404.
182. Palmer, C.N., et al., *Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 441-6.
183. Werfel, T., *The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 1878-91.
184. Ong, P.Y. and D.Y. Leung, *Immune dysregulation in atopic dermatitis*. Curr Allergy Asthma Rep, 2006. **6**(5): p. 384-9.
185. Werfel, T., et al., *Allergen specificity of skin-infiltrating T cells is not restricted to a type-2 cytokine pattern in chronic skin lesions of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(6): p. 871-6.
186. Hartwig, I.R., et al., *Prenatal adverse life events increase the risk for atopic diseases in children, which is enhanced in the absence of a maternal atopic predisposition*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(1): p. 160-9.
187. Wright, R.J., et al., *Chronic caregiver stress and IgE expression, allergen-induced proliferation, and cytokine profiles in a birth cohort predisposed to atopy*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(6): p. 1051-7.
188. Wright, R.J., R.T. Cohen, and S. Cohen, *The impact of stress on the development and expression of atopy*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2005. **5**(1): p. 23-9.
189. Pallanti, S., T. Lotti, and M. Urpe, *Psychoneuroimmunodermatology of atopic dermatitis: from empiric data to the evolutionary hypothesis*. Dermatol Clin, 2005. **23**(4): p. 695-701.

190. Gieler, U., et al., [*The psychosocial status of patients with endogenous eczema. A study using cluster analysis for the correlation of psychological factors with somatic findings*]. *Hautarzt*, 1990. **41**(8): p. 416-23.
191. Kilpelainen, M., et al., *Stressful life events promote the manifestation of asthma and atopic diseases*. *Clin Exp Allergy*, 2002. **32**(2): p. 256-63.
192. Hashizume, H., et al., *Anxiety accelerates T-helper 2-tilted immune responses in patients with atopic dermatitis*. *Br J Dermatol*, 2005. **152**(6): p. 1161-4.
193. Schmid-Ott, G., et al., *Different expression of cytokine and membrane molecules by circulating lymphocytes on acute mental stress in patients with atopic dermatitis in comparison with healthy controls*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(3): p. 455-62.
194. Liezmann, C., B. Klapp, and E.M. Peters, *Stress, atopy and allergy: A re-evaluation from a psychoneuroimmunologic perspective*. *Dermatoendocrinol*, 2011. **3**(1): p. 37-40.
195. Scholzen, T., et al., *Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems*. *Exp Dermatol*, 1998. **7**(2-3): p. 81-96.
196. Hendrix, S. and E.M. Peters, *Neuronal plasticity and neuroregeneration in the skin -- the role of inflammation*. *J Neuroimmunol*, 2007. **184**(1-2): p. 113-26.
197. Wessler, I., et al., *Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis*. *Life Sci*, 2003. **72**(18-19): p. 2169-72.
198. Heyer, G., M. Vogelgsang, and O.P. Hornstein, *Acetylcholine is an inducer of itching in patients with atopic eczema*. *J Dermatol*, 1997. **24**(10): p. 621-5.
199. Vogelgsang, M., G. Heyer, and O.P. Hornstein, *Acetylcholine induces different cutaneous sensations in atopic and non-atopic subjects*. *Acta Derm Venereol*, 1995. **75**(6): p. 434-6.
200. Curtis, B.J., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor stimulation impairs epidermal permeability barrier function and recovery and modulates cornified envelope proteins*. *Life Sci*, 2012. **91**(21-22): p. 1070-6.
201. Ehrlich, P., *Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukozyten*. *Arch. Anat. Physio.*, 1879(3): p. 166-169.
202. Rodewald, H.R., et al., *Identification of a committed precursor for the mast cell lineage*. *Science*, 1996. **271**(5250): p. 818-22.
203. Chen, C.C., et al., *Identification of mast cell progenitors in adult mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11408-13.
204. Kitamura, Y., K. Oboki, and A. Ito, *Molecular mechanisms of mast cell development*. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2006. **26**(3): p. 387-405; v.
205. Metcalfe, D.D., D. Baram, and Y.A. Mekori, *Mast cells*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 1033-79.
206. Kraft, S. and J.P. Kinet, *New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(5): p. 365-78.
207. Xiang, Z., et al., *IgE-mediated mast cell degranulation and recovery monitored by time-lapse photography*. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(1): p. 116-21.
208. Gordon, J.R., P.R. Burd, and S.J. Galli, *Mast cells as a source of multifunctional cytokines*. *Immunol Today*, 1990. **11**(12): p. 458-64.
209. Kay, L.J. and P.T. Peachell, *Mast cell beta2-adrenoceptors*. *Chem Immunol Allergy*, 2005. **87**: p. 145-53.
210. Kandere-Grzybowska, K., et al., *IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(9): p. 4830-6.
211. Slominski, A. and J. Wortsman, *Neuroendocrinology of the skin*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(5): p. 457-87.

212. Zmijewski, M.A. and A.T. Slominski, *Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis*. *Dermatoendocrinol*, 2011. **3**(1): p. 3-10.
213. Blandina, P., et al., *Characteristics of histamine release evoked by acetylcholine in isolated rat mast cells*. *J Physiol*, 1980. **301**: p. 281-93.
214. Fantozzi, R., et al., *Release of histamine from rat mast cells by acetylcholine*. *Nature*, 1978. **273**(5662): p. 473-4.
215. Schwartz, L.B., et al., *Quantitation of histamine, tryptase, and chymase in dispersed human T and TC mast cells*. *J Immunol*, 1987. **138**(8): p. 2611-5.
216. Pejler, G., et al., *Mast cell proteases*. *Adv Immunol*, 2007. **95**: p. 167-255.
217. Caughey, G.H., *Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense*. *Immunological reviews*, 2007. **217**: p. 141-54.
218. Huang, C., et al., *Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta 1 and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26276-84.
219. Andersson, M.K., U. Karlson, and L. Hellman, *The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase*. *Mol Immunol*, 2008. **45**(3): p. 766-75.
220. Waern, I., et al., *Mouse mast cell protease 4 is the major chymase in murine airways and has a protective role in allergic airway inflammation*. *J Immunol*, 2009. **183**(10): p. 6369-76.
221. Shin, K., et al., *Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4885-91.
222. Akahoshi, M., et al., *Mast cell chymase reduces the toxicity of *Gila monster* venom, scorpion venom, and vasoactive intestinal polypeptide in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(10): p. 4180-91.
223. Piliponsky, A.M., et al., *The chymase mouse mast cell protease 4 degrades TNF, limits inflammation, and promotes survival in a model of sepsis*. *Am J Pathol*, 2012. **181**(3): p. 875-86.
224. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. *Nat Med*, 2012. **18**(5): p. 693-704.
225. Hofmann, A.M. and S.N. Abraham, *New roles for mast cells in pathogen defense and allergic disease*. *Discov Med*, 2010. **9**(45): p. 79-83.
226. Amin, K., *The role of mast cells in allergic inflammation*. *Respiratory medicine*, 2012. **106**(1): p. 9-14.
227. Liu, F.T., H. Goodarzi, and H.Y. Chen, *IgE, mast cells, and eosinophils in atopic dermatitis*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2011. **41**(3): p. 298-310.
228. Gregory, G.D. and M.A. Brown, *Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity*. *Methods Mol Biol*, 2006. **315**: p. 35-50.
229. Walker, M.E., J.K. Hatfield, and M.A. Brown, *New insights into the role of mast cells in autoimmunity: evidence for a common mechanism of action?* *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(1): p. 57-65.
230. Metz, M., F. Siebenhaar, and M. Maurer, *Mast cell functions in the innate skin immune system*. *Immunobiology*, 2008. **213**(3-4): p. 251-60.
231. Abraham, S.N. and M. Arock, *Mast cells and basophils in innate immunity*. *Semin Immunol*, 1998. **10**(5): p. 373-81.
232. Weber, A., J. Knop, and M. Maurer, *Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping*. *Br J Dermatol*, 2003. **148**(2): p. 224-8.

233. Marshall, J.S., *Mast-cell responses to pathogens*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(10): p. 787-99.
234. Huang, C., et al., *Induction of a selective and persistent extravasation of neutrophils into the peritoneal cavity by tryptase mouse mast cell protease 6*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1910-9.
235. Malaviya, R., et al., *Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha*. Nature, 1996. **381**(6577): p. 77-80.
236. Malaviya, R. and S.N. Abraham, *Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(6): p. 841-6.
237. Di Nardo, A., A. Vitiello, and R.L. Gallo, *Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2274-8.
238. Malaviya, R., et al., *Mast cells process bacterial Ags through a phagocytic route for class I MHC presentation to T cells*. J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1490-6.
239. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai, *Mast cells in the development of adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 135-42.
240. Depinay, N., et al., *Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites*. Journal of immunology, 2006. **176**(7): p. 4141-6.
241. Orinska, Z., et al., *IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 927-34.
242. Thakurdas, S.M., et al., *The mast cell-restricted tryptase mMCP-6 has a critical immunoprotective role in bacterial infections*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20809-15.
243. Irani, A.M., H.A. Sampson, and L.B. Schwartz, *Mast cells in atopic dermatitis*. Allergy, 1989. **44 Suppl 9**: p. 31-4.
244. Soter, N.A., *Morphology of atopic eczema*. Allergy, 1989. **44 Suppl 9**: p. 16-9.
245. Zhao, L., et al., *A rodent model for allergic dermatitis induced by flea antigens*. Vet Immunol Immunopathol, 2006. **114**(3-4): p. 285-96.
246. Ohmen, J.D., et al., *Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions*. J Immunol, 1995. **154**(4): p. 1956-63.
247. Ring, J. and P. Thomas, *Histamine and atopic eczema*. Acta Derm Venereol Suppl (Stockh), 1989. **144**: p. 70-7.
248. Hamid, Q., et al., *In vivo expression of IL-12 and IL-13 in atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 1996. **98**(1): p. 225-31.
249. Horsmanheimo, L., et al., *Mast cells are one major source of interleukin-4 in atopic dermatitis*. Br J Dermatol, 1994. **131**(3): p. 348-53.
250. Watanabe, N., et al., *Chymase inhibitor improves dermatitis in NC/Nga mice*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **128**(3): p. 229-34.
251. Steinhoff, M., et al., *Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin*. J Neurosci, 2003. **23**(15): p. 6176-80.
252. Watanabe, N., et al., *Oral administration of chymase inhibitor improves dermatitis in NC/Nga mice*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(4): p. 971-3.
253. Terakawa, M., et al., *Oral chymase inhibitor SUN13834 ameliorates skin inflammation as well as pruritus in mouse model for atopic dermatitis*. Eur J Pharmacol, 2008. **601**(1-3): p. 186-91.
254. Lindsay, R.M. and A.J. Harmar, *Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons*. Nature, 1989. **337**(6205): p. 362-4.

255. Siebenhaar, F., et al., *Mast cell-driven skin inflammation is impaired in the absence of sensory nerves*. The Journal of allergy and clinical immunology, 2008. **121**(4): p. 955-61.
256. Bernstein, J.E., *Capsaicin in dermatologic disease*. Semin Dermatol, 1988. **7**(4): p. 304-9.
257. Steinhoff, M., et al., *Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 151-8.
258. Tsujii, K., et al., *Involvement of Tryptase and Proteinase-Activated Receptor-2 in Spontaneous Itch-Associated Response in Mice With Atopy-like Dermatitis*. J Pharmacol Sci, 2009. **109**(3): p. 388-95.
259. Tam, E.K. and G.H. Caughey, *Degradation of airway neuropeptides by human lung tryptase*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **3**(1): p. 27-32.
260. Nechushtan, H., et al., *Murine and human mast cell express acetylcholinesterase*. FEBS Lett, 1996. **379**(1): p. 1-6.
261. Yamamoto, T., et al., *Anti-allergic role of cholinergic neuronal pathway via alpha7 nicotinic ACh receptors on mucosal mast cells in a murine food allergy model*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85888.
262. Cho, S.H., et al., *Preferential binding of Staphylococcus aureus to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model*. J Invest Dermatol, 2001. **116**(5): p. 658-63.
263. Rommel, F.R., et al., *Suitability of Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha7 and Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Antibodies for Immune Detection: Evaluation in Murine Skin*. J Histochem Cytochem, 2015.
264. Orr-Urtreger, A., et al., *Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents*. J Neurosci, 1997. **17**(23): p. 9165-71.
265. Yamada, M., et al., *Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 207-12.
266. Tallini, Y.N., et al., *BAC transgenic mice express enhanced green fluorescent protein in central and peripheral cholinergic neurons*. Physiol Genomics, 2006. **27**(3): p. 391-7.
267. Moriwaki, Y., et al., *Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand*. Neurosci Res, 2009. **64**(4): p. 403-12.
268. Sawada, K., et al., *The expression of murine cutaneous late phase reaction requires both IgE antibodies and CD4 T cells*. Clin Exp Allergy, 1997. **27**(2): p. 225-31.
269. Pavlovic, S., et al., *Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation*. J Immunol, 2011. **186**(2): p. 848-55.
270. Peters, E.M., et al., *Neurogenic inflammation in stress-induced termination of murine hair growth is promoted by nerve growth factor*. Am J Pathol, 2004. **165**(1): p. 259-71.
271. Moser, N., et al., *Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures*. J Neurochem, 2007. **102**(2): p. 479-92.
272. Malbec, O., et al., *Peritoneal cell-derived mast cells: an in vitro model of mature serosal-type mouse mast cells*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6465-75.
273. Tharp, M.D., et al., *Conjugated avidin binds to mast cell granules*. J Histochem Cytochem, 1985. **33**(1): p. 27-32.
274. Hillert, M.H., et al., *Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats*. J Neurochem, 2014. **131**(1): p. 42-52.
275. Klein, J., et al., *Free choline and choline metabolites in rat brain and body fluids: sensitive determination and implications for choline supply to the brain*. Neurochem Int, 1993. **22**(3): p. 293-300.

276. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
277. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
278. Brown, D., et al., *Antigen retrieval in cryostat tissue sections and cultured cells by treatment with sodium dodecyl sulfate (SDS)*. Histochem Cell Biol, 1996. **105**(4): p. 261-7.
279. Botchkarev, V.A., et al., *A simple immunofluorescence technique for simultaneous visualization of mast cells and nerve fibers reveals selectivity and hair cycle--dependent changes in mast cell--nerve fiber contacts in murine skin*. Arch Dermatol Res, 1997. **289**(5): p. 292-302.
280. Pavlov, V.A., et al., *The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation*. Mol Med, 2003. **9**(5-8): p. 125-34.
281. Tracey, K.J., *Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway*. J Clin Invest, 2007. **117**(2): p. 289-96.
282. Herber, D.L., et al., *Biochemical and histochemical evidence of nonspecific binding of alpha7nAChR antibodies to mouse brain tissue*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(10): p. 1367-76.
283. Jositsch, G., et al., *Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(4): p. 389-95.
284. Osborne-Hereford, A.V., S.W. Rogers, and L.C. Gahring, *Neuronal nicotinic alpha7 receptors modulate inflammatory cytokine production in the skin following ultraviolet radiation*. J Neuroimmunol, 2008. **193**(1-2): p. 130-9.
285. Elenkov, I.J., et al., *Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **876**: p. 1-11; discussion 11-3.
286. Glaser, R., et al., *Evidence for a shift in the Th-1 to Th-2 cytokine response associated with chronic stress and aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2001. **56**(8): p. M477-82.
287. Grando, S.A., et al., *The non-neuronal cholinergic system: basic science, therapeutic implications and new perspectives*. Life Sci, 2012. **91**(21-22): p. 969-72.
288. Mark, G.P., P.V. Rada, and T.J. Shors, *Inescapable stress enhances extracellular acetylcholine in the rat hippocampus and prefrontal cortex but not the nucleus accumbens or amygdala*. Neuroscience, 1996. **74**(3): p. 767-74.
289. Darsow, U., U. Raap, and S. Stander, *Atopic Dermatitis*, in *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens and T. Akiyama, Editors. 2014: Boca Raton (FL).
290. Hana, A., et al., *Functional significance of non-neuronal acetylcholine in skin epithelia*. Life Sci, 2007. **80**(24-25): p. 2214-20.
291. Yoo, J., et al., *Systemic sensitization with the protein allergen ovalbumin augments local sensitization in atopic dermatitis*. J Inflamm Res, 2014. **7**: p. 29-38.
292. Jin, H., et al., *Animal models of atopic dermatitis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 31-40.
293. Shiohara, T., J. Hayakawa, and Y. Mizukawa, *Animal models for atopic dermatitis: are they relevant to human disease?* J Dermatol Sci, 2004. **36**(1): p. 1-9.
294. Leung, D.Y., *New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation*. Allergol Int, 2013. **62**(2): p. 151-61.
295. Grewe, M., et al., *A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 359-61.

296. Brandt, E.B. and U. Sivaprasad, *Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis*. J Clin Cell Immunol, 2011. **2**(3).
297. Bohm, I. and R. Bauer, *[Th1 cells, Th2 cells and atopic dermatitis]*. Hautarzt, 1997. **48**(4): p. 223-7.
298. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
299. Eyerich, K. and N. Novak, *Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm*. Allergy, 2013. **68**(8): p. 974-82.
300. Jacobi, A., et al., *Infliximab in the treatment of moderate to severe atopic dermatitis*. J Am Acad Dermatol, 2005. **52**(3 Pt 1): p. 522-6.
301. Elenkov, I.J. and G.P. Chrousos, *Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. **966**: p. 290-303.
302. Nockher, W.A. and H. Renz, *Neurotrophins in allergic diseases: from neuronal growth factors to intercellular signaling molecules*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(3): p. 583-9.
303. Namura, K., et al., *Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor level with other markers of disease severity in patients with atopic dermatitis*. Clin Immunol, 2007. **122**(2): p. 181-6.
304. Raap, U., et al., *Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with disease severity in the intrinsic type of atopic dermatitis*. Allergy, 2006. **61**(12): p. 1416-8.
305. Peters, E.M., et al., *Control of human hair growth by neurotrophins: brain-derived neurotrophic factor inhibits hair shaft elongation, induces catagen, and stimulates follicular transforming growth factor beta2 expression*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(4): p. 675-85.
306. Olofsson, P.S., et al., *Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 188-204.
307. Trivedi, N.N. and G.H. Caughey, *Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(3): p. 257-67.
308. Beghdadi, W., et al., *Mast cell chymase protects against renal fibrosis in murine unilateral ureteral obstruction*. Kidney Int, 2013.
309. Hendrix, S., et al., *Mast cells protect from post-traumatic brain inflammation by the mast cell-specific chymase mouse mast cell protease-4*. FASEB J, 2013. **27**(3): p. 920-9.
310. Lawrence, C.E., et al., *Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 155-65.
311. Mellon, M.B., B.T. Frank, and K.C. Fang, *Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 290-7.
312. Metz, M., et al., *Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms*. Science, 2006. **313**(5786): p. 526-30.
313. Roy, A., et al., *Mast cell chymase degrades the alarmins heat shock protein 70, biglycan, HMGB1, and interleukin-33 (IL-33) and limits danger-induced inflammation*. J Biol Chem, 2014. **289**(1): p. 237-50.
314. Zhao, W., et al., *Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2635-42.
315. Siebenhaar, F., et al., *The search for Mast Cell and Basophil models - Are we getting closer to pathophysiological relevance?* Allergy, 2014.

316. Kitamura, Y., *Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations*. *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 59-76.
317. Passante, E., *Mast cell and basophil cell lines: a compendium*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1192**: p. 101-13.
318. Wahlgren, C.F., *Itch and atopic dermatitis: an overview*. *J Dermatol*, 1999. **26**(11): p. 770-9.
319. Stander, S. and M. Steinhoff, *Pathophysiology of pruritus in atopic dermatitis: an overview*. *Exp Dermatol*, 2002. **11**(1): p. 12-24.

Publikationsverzeichnis

Veröffentlichungen

Rommel, F.R., et al., *Suitability of Nicotinic Acetylcholine Receptor alpha7 and Muscarinic Acetylcholine Receptor 3 Antibodies for Immune Detection: Evaluation in Murine Skin*. J Histochem Cytochem, 2015

Rommel, F.R., et al., *Sphenoid Wing Dysplasia with Pulsatile Exophthalmos in Neurofibromatosis Type 1*. Neuropediatrics, 2016.

Poster

“Stress alters cytokine expression in skin: potential links to stress-induced NNCS regulation in skin”, 1. Jahrestagung des LOEWE Schwerpunkts „Non-neuronale cholinerge Systeme“, Giessen, Deutschland, 20.11.2012

“Stress, allergy and the skin: altered cytokine profile may be linked to the non-neuronal cholinergic system (NNCS)”, PNIRS 2013, Stockholm, Schweden, 05.06.2013 - 08.06.2013

“Stress alters cytokine profile of the skin: prospective links to stress-induced NNCS regulation in the skin”, ISAN-EFAS 2013, Giessen, Deutschland

“Evaluation of suitability acetylcholine receptor antibodies for immune detection in peripheral tissues”, ISAN-EFAS 2013, Giessen, Deutschland, 08.07.2013 - 14.07.2013

“The non-neuronal cholinergic system (NNCS) and cutaneous inflammation in a mouse model for atopic dermatitis-like-allergic inflammation”, ADF 2014, Köln, Deutschland, 13.03.2014 - 15.03.2014

“Stress alters cytokine profile of the skin: prospective links to stress-induced NNCS regulation in skin”, ISNI/ESNI, Mainz, Deutschland, 09.11.2014 - 13.11.2014

“Stress affects mast cell protease expression: potential role of cholinergic signalling”, GEBIN, München, Deutschland, 23.04.2015 - 25.04.2015

“Mast cell protease expression is affected by stress and cholinergic signaling”, ECI, Wien, Österreich, 06.09.2015 - 09.09.2015

Vorträge

“Das non-neuronale cholinerge System (NNCS): Entspannung für die Immunantwort?”, DKPM 2014, Berlin, Deutschland, 27.03.2014

„Stress induced changes in the cytokine profile of the skin: potential links to NNCS regulation“, DGfI, 2014, Bonn, Deutschland, 17.09.2014

“Stress affects mast cell protease expression: potential role of cholinergic signalling”, GEBIN, München, Deutschland, 23.04.2015 - 25.04.2015

Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Eva Peters für die Überlassung des Themas und ihre exzellente Betreuung während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit. Ihre stetige Gesprächsbereitschaft, die fachlich kompetente Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen haben zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Ein großes Dankeschön gebührt auch der gesamten Arbeitsgruppe des Psychoneuroimmunologie Labors, insbesondere Susanne Tumala, Sandra Laux, Laura Ivanovas und Badrinarayanan Raghavan, für deren Einsatz, Engagement und die gute Zeit im Labor.

Danken möchte ich auch dem gesamten Konsortium des Forschungsschwerpunktes „Non-neuronale cholinerge Systeme“ der Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) des Landes Hessen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kummer und dessen gesamter Arbeitsgruppe, Herrn Dr. Amir Rafiq, Frau Dr. Renate Paddenberg, Herrn Dr. Burkhard Schütz, Herrn Prof. Dr. Weihe, Herrn Prof. Dr. Lochnit, Herrn Prof. Dr. Klein und Frau Prof. Dr. Adriana del Rey für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung meines Projektes. Im LOEWE Projekt trugen die interdisziplinäre Kommunikation, regelmäßige Seminare und Kongresse zum wissenschaftlichen Erfolg meiner Arbeit bei.

Danken möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Linn für die gute Zusammenarbeit.

Der Justus Liebig Universität Gießen möchte ich für die Förderung dieses Forschungsvorhabens im Rahmen des Graduiertenprogrammes danken.

Herrn Prof. Dr. Kruse und Herrn Prof. Dr. Gieler danke ich für die gelungene wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Luise Döring danke ich für die stetige Aufmunterung und die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Alexander Koch möchte ich für das Gegenlesen danken.

Christina Brei möchte ich herzlich danken, da sie mich mit zahlreichen hilfreichen Tipps, moralisch, fachlich und methodisch unterstützt hat und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Nicht zuletzt geht mein Dank an Karoline Zessin, die mich während der gesamten Dauer meiner Doktorarbeit aufgebaut und unterstützt hat.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6470-9



9 783835 196470 9