

Die Expression und entzündungsabhängige Regulation
von *Fibroblast Growth Factor*-Rezeptoren in
bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen und der Rezeptor-
Liganden in der Mauslunge

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

vorgelegt von
Rebecca Böhmer
aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Eveline Baumgart-Vogt

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Kummer
Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Rosengarten

Tag der Disputation: 19.05.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Asthma bronchiale	1
1.1.1 Die allergische Reaktion	3
1.1.1.1 Die Sensibilisierung	3
1.1.1.2 Die Effektorphase	4
1.1.2 Das <i>Airway Remodeling</i>	4
1.1.3 Die Atemwegshyperreagibilität	5
1.2 Die Innervation der Lunge	6
1.2.1 Die autonome Innervation	6
1.2.2 Die sensorische Innervation	7
1.3 Die neuronale Hyperreagibilität	10
1.4 Die <i>Fibroblast Growth Factor</i>-Familie	11
1.4.1 <i>Fibroblast Growth Factors</i>	11
1.4.2 <i>Fibroblast Growth Factor</i> -Rezeptoren	12
1.5 FGFs und Asthma bronchiale	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Materialien allgemein	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Reagenzien	16
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	16
2.2 Versuchstiere und Tierhaltung	17
2.2.1 Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentszündung	17
2.2.1.1 Sensibilisierung durch Allergenapplikation	17
2.2.1.2 Allergenchallenge	17
2.2.2 Retrogrades Markieren von bronchopulmonalen Afferenzen	18
2.2.3 Tierschutzgerechte Tötung und Präparation	19
2.3 Untersuchungen der allergischen Atemwegsinfammation	20
2.3.1 Bronchoalveoläre Lavage	20
2.3.1.1 Absolute Gesamtzellzahlbestimmung	20
2.3.1.2 Zelldifferenzierung	21

2.3.2 Histologie	21
2.3.2.1 Fixierung, Entwässern und Einbetten in Paraffin	22
2.3.2.2 Anfertigen von Paraffinschnitten	22
2.3.2.3 Histologische Färbungen	23
2.3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	23
2.3.2.3.2 Periodic acid-Schiff-Färbung	24
2.3.2.3.3 Masson-Goldner-Färbung	25
2.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	26
2.4.1 RNA-Isolation und c-DNA-Synthese bei der <i>standard</i> RT-PCR	26
2.4.1.1 RNA-Isolation	26
2.4.1.2 DNase-Verdau und reverse Transkription	27
2.4.2 Vorbereitung der <i>single-cell</i> RT-PCR	28
2.4.2.1 Zell-Dissoziation	29
2.4.2.2 <i>Cell Picking</i>	30
2.4.2.3 DNase-Verdau und reverse Transkription auf <i>single-cell</i> Ebene	31
2.4.3 Qualitative RT-PCR	32
2.4.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	34
2.4.5 Quantitative RT-PCR	35
2.4.6 Restriktionsenzymverdau	36
2.4.7 Sequenzierung	36
2.4.7.1 Agarosegel-Extraktion	36
2.4.7.2 Externe Sequenzierung	37
2.5 Western Blot	38
2.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes	38
2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
2.5.4 <i>Semi-Dry</i> -Blot	42
2.5.5 Immundetektion	43
2.6 Immunhistochemie	45
2.6.1 Herstellung von Kryostatschnitten	45
2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung	46
2.7 Auswaschsassay	47
2.8 Statistik	49

3. Ergebnisse	50
3.1 Nachweis der allergischen Atemwegsinfammation in der Mauslunge	50
3.1.1 Auswertung der BAL	50
3.1.1.1 Absolute Gesamtzellzahl	51
3.1.1.2 Differentialzytologie	51
3.1.2 Histologie der Lunge	55
3.1.2.1 H.E.-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation	55
3.1.2.2 PAS-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation	55
3.1.2.3 Masson-Goldner-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation	58
3.2 Nachweis der FGFR in atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum	59
3.2.1 FGFR-mRNA-Expression in atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum	59
3.2.2 mRNA-Expression der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante	62
3.2.3 Western Blot Analyse von FGFR1 in JNG	67
3.3 Nachweis von FGFs in der Mauslunge	68
3.3.1 mRNA-Expression von Liganden der FGFR1 IIIc-Variante in der Mauslunge mit und ohne allergischer Atemwegsentszündung	68
3.3.1.1 Qualitative RT-PCR Analyse	69
3.3.1.2 Quantitative RT-PCR Analyse	71
3.3.2 Western Blot-Analyse von FGFs in der Mauslunge mit und ohne allergischer Atemwegsentszündung	75
3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von FGF2 in der Mauslunge mit und ohne allergische Atemwegsentszündung	79
3.4 Funktioneller Einfluss der FGFs auf sensorische Neurone des JNG	81
3.4.1 Auswachsassay	81
4. Diskussion	84
4.1 Etablierung eines Mausmodells für die akute allergische Entzündung der Atemwege	85

4.2 FGFR-Expression in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum	88
4.3 Expression der FGFR1-Varianten in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum	90
4.4 Expression von FGFs in der Mauslunge	91
4.5 FGF2 und dessen Regulation im allergischen Asthma bronchiale	95
4.6 Funktionelle Bedeutung der FGFs auf sensorische Neurone	99
4.7 Schlussfolgerung	102
5. Zusammenfassung	103
6. Summary	104
7. Abkürzungsverzeichnis	105
8. Literaturverzeichnis	109
9. Anhang	122
9.1 Sequenzen der verwendeten Primer und PCR-Bedingungen	122
10. Publikationsverzeichnis	125
11. Ehrenwörtliche Erklärung	126
12. Danksagung	127

1. Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

Das allergische Asthma ist eine global verbreitete, chronisch-entzündliche Funktionsstörung der Atemwege, unter der weltweit heutzutage schätzungsweise 300 Millionen Menschen leiden (Herold 2013; www.ginasthma.org). Insbesondere ist eine steigende Inzidenz in den Industrienationen zu verzeichnen, deren Ursache wahrscheinlich in einem urban geprägten Lebensstil und der reduzierten Konfrontation mit pathogenen und ubiquitär auftretenden Keimen zu suchen ist (Hudemann et al. 2010). Klinisch präsentiert sich das Krankheitsbild durch immer wiederkehrende, anfallsartig auftretende Atemnot mit Giemen, Husten und Engegefühl im Brustbereich, insbesondere in der Nacht oder in den frühen Morgenstunden. Die Episoden gehen mit einer variablen und reversiblen Bronchoobstruktion einher, welche durch einen Spasmus der Bronchialmuskulatur, einer Hypersekretion von zähem Schleim und einem Ödem der Atemwegswand bedingt sind. In der Regel remittieren die Symptome entweder spontan oder nach Therapie, wohingegen die Atemwegsinfammation chronisch präsent bleibt (Herold 2013; www.ginasthma.org). Bislang existiert ein breites Spektrum an symptomverbessernden Therapieansätzen, dessen pharmakologische Wirkung insbesondere auf die Unterdrückung der Entzündung bzw. die Bronchospasmyse abzielt. Jedoch bestehen bis dato keine kausalspezifischen Interventionsmöglichkeiten, welche die Entwicklung der beiden wesentlichen Charakteristika des Asthma bronchiale unterbinden: Das *Airway Remodeling* und die Atemwegshyperreagibilität (AHR). Letztere ist gekennzeichnet durch eine bei nahezu allen Asthmatikern nachweisliche Überempfindlichkeit der Atemwege gegenüber unspezifischen Reizen wie Ozon, kalter Luft oder Zigarettenrauch. Der Pathomechanismus der AHR ist bis heute weitgehend ungeklärt. Jedoch ist dessen Verständnis, insbesondere aufgrund des hohen individuellen Leidensdrucks der Betroffenen durch die daraus resultierenden Atemnotattacken, von hoher Notwendigkeit, um neuartige Therapiekonzepte aufstellen zu können.

Zweifelsfrei liegt beim Asthma bronchiale eine inflammatorische Fehlsteuerung der Atemwege vor, in der aktivierte Mastzellen und Eosinophile durch die Freisetzung entzündlicher Mediatoren als Hauptprotagonisten fungieren (Kay 1991). In der Vergangenheit konnte beobachtet werden, dass die Entwicklung der AHR mit der Präsenz einer Atemwegsentszündung assoziiert ist, wobei die Entzündungsmediatoren ursächlich

bei deren Entstehung verantwortlich zu sein scheinen (Murphy et al. 1986; Nassenstein et al. 2007). Aufgrund der limitierten Effekte einer rein anti-inflammatorischen Therapie durch beispielsweise inhalative Glukokortikoide, ist anzunehmen, dass es im Verlauf der Erkrankung langfristig zu einer Entkopplung von allergeninduzierter Entzündung und AHR kommt (Cockcroft und Davis 2006).

In diesem Zusammenhang ist bezüglich der Genese der AHR zunehmend eine neuronale Dysregulation, insbesondere aufgrund struktureller und funktioneller Veränderungen der bronchopulmonalen sensorischen C-Faser-Neurone, in den Fokus der Forschung gerückt (Undem und Nassenstein 2009; Verleden 1996). Diese Nervenzellen sind mit einem Rezeptorsystem (*Transient Receptor Potential* (TRP)-Kanäle) ausgestattet, welches durch die oben beschriebenen Umweltirritanzen stimuliert wird (Clapham 2003). Außerdem stellen sie die Zellpopulation dar, deren Aktivierung die Symptome der bronchialen Hyperreagibilität wie anfallsartig einsetzende Luftnot mit Husten und expiratorischen Stridor durch die Verschaltung zentraler Reflexe via Parasympathikus (Undem und Nassenstein 2009), aber auch lokaler axonaler Reflexe mit Neuropeptidausschüttung beeinflussen kann (Barnes 1995; 1986). Beim allergischen Asthma bronchiale liegt im Vergleich zur gesunden Lunge nachweislich eine Hyperinnervation durch die sensorischen Neurone (Goldie et al. 2001; Ogawa et al. 2012), eine gesteigerte Neuropeptidsynthese (Goldie 2001; Fischer 1996) und eine Überexpression von den TRP-Kanälen vor (Geppetti et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass diese strukturellen und funktionellen Veränderungen als langfristige Anpassung aus der Interaktion mit bestimmten im Rahmen der Inflammation vermehrt anfallenden Mediatoren resultieren (Undem und Nassenstein 2009; Barnes 1992).

Erst kürzlich wurde eine Spiegelerhöhung des potenten Zytokins *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2) im Sputum von Asthmatikern gegenüber gesunden Kontrollen beschrieben (Bissonnette et al. 2014). In vorangegangenen Studien konnten seine mitogenen Effekte auf Muskulatur, Fibroblasten und Endothelzellen bereits in Zusammenhang mit der Pathogenese des *Airway Remodeling* gebracht werden (Zou et al. 2008; Hoshino et al. 2001; Bossé et al. 2006). Inwieweit FGF2, aber auch andere Mitglieder der *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-Familie, Einfluss auf die AHR nehmen können, ist bislang unklar. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob FGFs als neue Kandidaten für die Regulation sensorischer C-Faser-Neurone in den Atemwegen der Maus in Frage kommen.

1.1.1 Die allergische Reaktion

In die Definition des Asthma bronchiale fällt auf der einen Seite ein allergisches bzw. extrinsisches Asthma, welches beispielsweise durch Hausstaub, Pollen oder Tierhaare hervorgerufen werden kann. Sein Beginn liegt in der Regel im Kindes- oder frühen Erwachsenenalter und steht meist im Zusammenhang mit einer Atopie. Auf der anderen Seite steht ein nicht-allergisches, intrinsisches Asthma, das unter anderem durch Infekte, Analgetika wie Azetylsalizylsäure oder chemisch-irritative Substanzen erzeugt wird und typischerweise einen Erkrankungsbeginn jenseits des 40. Lebensjahres zeigt (Herold 2013; www.ginasthma.org). Nachfolgend soll genauer auf die bislang bekannte Pathogenese des allergischen Asthmas eingegangen werden.

1.1.1.1 Die Sensibilisierung

Eine Allergie resultiert aus dem Toleranzverlust des körpereigenen Immunsystems gegenüber einem primär harmlosen Umweltantigen. Diese Entgleisung der adaptiven Abwehrmechanismen führt zu einer inadäquaten und überschießenden Immunantwort. Nach dem ihm zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus wird das allergische Asthma bronchiale klassischerweise der Reaktion vom Soforttyp (Typ I) nach Coombs und Gell zugeordnet (Gell und Coombs 1963). Dessen Pathogenese beginnt mit einer immunologischen Sensibilisierung, bei der eine an sich nicht pathogene Substanz von Antigen-präsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, aufgenommen wird. Endozytierte Antigen-Moleküle werden proteolytisch zerschnitten und gekoppelt an MHC-II-Moleküle an der Zelloberfläche den naiven T-Zellen dargeboten. Diese erkennen den MHC-II-Molekül/Antigen-Komplex und differenzieren sich zur CD4⁺-T-Helferzellen vom Typ 2 (T_{H2}-Zellen). Als unterstützendes Element der humoralen Abwehr interagieren sie über Oberflächenmoleküle mit naiven B-Zellen und stimulieren über ihre Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 die Proliferation und Ausdifferenzierung zu spezifisch gegen das Allergen gerichteten, antikörperproduzierenden Plasmazellen. Insbesondere IL-4 und IL-13 stellen Helfersignale für den Isotypenwechsel auf Immunglobuline der Klasse E (IgE) dar, welchen eine Schlüsselrolle bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp zugesprochen wird. Sie binden an den Fc_ε-Rezeptor I auf der Oberfläche von Mastzellen sowie basophilen Granulozyten und sensibilisieren diese damit gegen das Umweltallergen (Joo und Kau 2013; Buhl et al. 2011).

1.1.1.2 Die Effektorphase

In der sog. Frühphasereaktion führt ein erneuter Allergenkontakt zur Bindung des Allergens mit anschließender Kreuzvernetzung der membranständigen IgE-Moleküle, was die Aktivierung und Degranulation der Mastzellen nach sich zieht. Innerhalb weniger Minuten beginnen diese mit der Ausschüttung der präformiert in Granula vorliegenden Mediatoren, wie biogenen Aminen (Histamin), Proteasen und Hydrolasen, sowie der *de novo* Synthese von Arachidonsäure-Derivaten und Zytokinen (Buhl et al. 2011; Joo und Kau 2013).

Bei der allergeninduzierten Spätphasereaktion handelt es sich um eine zweite, 4-8 Stunden zeitversetzt erneut auftretende Atemnot, die histopathologisch insbesondere durch ein zelluläres Entzündungsinfiltrat gekennzeichnet ist. In der Frühphase freigesetzte Mediatoren besitzen chemotaktische Eigenschaften, die die Migration von Immunzellen, insbesondere der Eosinophilen, aber auch der T_{H2}-Zellen, basophilen und neutrophilen Granulozyten, in das Lungenparenchym bewirken (Joo und Kau 2013). Die infiltrierten Entzündungszellen setzen wiederum selbst proinflammatorische Substanzen frei und sorgen durch einen sich wechselseitig verstärkenden Mechanismus dafür, dass die Entzündungsreaktion aufrechterhalten wird. Aus einer lang andauernden oder wiederholten Allergenexposition resultiert letztendlich die Chronifizierung der Atemwegsentzündung. Das Zusammenspiel von destruktiven und reparativen Prozessen führt zu einem irreversiblen Umbau der Lunge, dem sogenannten *Airway Remodeling*. Ebenso entwickeln die meisten Betroffenen im Verlauf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber inhalativen Umweltirritanzen, aus welcher Atemnotattacken resultieren, die laut Patientenbefragungen sogar häufiger und stärker ausgeprägt sind als die durch das ursprüngliche Allergen ausgelösten Asthmaanfälle (Ritz et al. 2006). Im Folgenden soll genauer auf die beiden Merkmale *Airway Remodeling* und AHR eingegangen werden.

1.1.2 Das *Airway Remodeling*

Das Charakteristikum des *Airway Remodeling* ist eine Verdickung der Bronchialwand, welche auf verschiedene Faktoren zurückzuführen ist:

Ein wichtiges histopathologisches Merkmal stellt dabei die Verdickung der bronchialen Atemwegsmuskulatur dar. Sie wurde bereits 1922 erstmalig von Huber und Koessler beschrieben (Huber und Koessler 1922) und ist auf eine Hypertrophie und -plasie der Myozyten zurückzuführen. Außerdem wird eine Hypervaskularisierung, charakterisiert durch eine Zunahme in Größe und Anzahl der submukösen Blutgefäße, beobachtet. Im

Zusammenspiel mit einer Gefäßdilatation und einer gestörten Gefäßpermeabilität bildet sich ein submuköses Ödem. Zudem erleichtert das vaskuläre *Remodeling* die Diapedese entzündlicher Zellen (Elias 2000; Saetta und Turato 2001). Durch die gesteigerte Aktivität von Fibroblasten kommt es in Folge der vermehrten subepithelialen Kollagendeposition in der Lamina reticularis zur Verbreiterung der Basalmembran (Saetta und Turato 2001; Elias 2000). Ebenso charakteristisch ist eine Hyperplasie der Becherzellen und Hypertrophie der Bronchialdrüsen, die durch die Absonderung von übermäßig viel zähem Schleim (Hyper- und Dyskrinie) zusätzlich das Lumen der Luftwege verlegen.

Durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sowie zytotoxischer Proteine wie dem *Major Basic Protein* (MBP) oder dem *Eosinophil Cationic Protein* (ECP) sorgen insbesondere die Eosinophilen für eine Schädigung des Bronchialepithels, wobei vor allem die Flimmerzellen betroffen sind (Filley et al. 1982). Die chronische Epithelschädigung zeigt ein Nebeneinander von hypertrophischen und abgeschilferten Regionen und führt langfristig zu dessen Vernarbung mit Verlust der mukoziliären Reinigung.

1.1.3 Die Atemwegshyperreagibilität

Im Verlauf der Chronifizierung der Erkrankung kommt es neben der Sensibilisierung gegen das ursprüngliche Allergen zusätzlich zu einer persistierenden Überempfindlichkeit der Atemwege gegenüber unspezifischen Reizen. Dies geht einher mit einer gesteigerten Bereitschaft zur Bronchokonstriktion. Zu den Triggern zählen u.a. physikalische Stimuli wie Kaltluft, aber auch körperliche Anstrengung, Ozon, Tabakrauch oder Autoabgase. Im klinischen Alltag erfolgt der Nachweis anhand eines Provokationstestes mit einer bronchospastisch wirkenden Testsubstanz, wie Methacholin, auf die an Asthma erkrankte Menschen schon bei weitaus niedrigeren Dosen mit einer Bronchokonstriktion reagieren als Gesunde (Herold 2013).

Als Pathomechanismus zur Entstehung der Hyperreagibilität werden unterschiedliche Ansätze diskutiert. Zum einen wird über einen aberranten Phänotyp der glatten Atemwegsmuskulatur nachgedacht, welcher aufgrund einer erhöhten Kontraktilitätsneigung im Zusammenspiel mit einer Vermehrung der Muskelmasse nach Reizung zu einer unverhältnismäßig starken Bronchoobstruktion führt (Borger et al. 2006). Außerdem wird ein Ungleichgewicht zwischen den muskarinergen Rezeptoren M₂ an der prä- und M₃ an der postsynaptischen Membran diskutiert. Während die Bindung von Acetylcholin (ACh) an seinen M₃-Rezeptor zu einer Konstriktion der

Bronchialmuskulatur führt, wird über die M₂-Rezeptoren im Sinne eines negativen *Feedback* die präsynaptische Acetylcholinausschüttung inhibiert. Fryer et al. beschrieben 1998 erstmals, dass das durch Eosinophile freigesetzte MBP dazu in der Lage ist, die Bindungsstelle am M₂-Rezeptor zu blockieren, und auf diesem Wege die negative Rückkopplung von ACh zu unterbinden (Fryer und Jacoby 1998).

Diese Theorien der „muskulären Hyperreagibilität“ sowie die im klinischen Alltag angewendeten Provokationstests setzen direkt an der autonomen neuromuskulären Übertragungsstelle an. Sie können zwar einen Zusammenhang mit der gesteigerten Kontraktionsbereitschaft der Muskulatur von Patienten mit AHR herstellen, jedoch erklären sie nicht die Überempfindlichkeit der Betroffenen gegenüber den beschriebenen Umweltirritanzien sowie die Entstehung der Symptome der Atemwegshyperreagibilität, wie z.B. Husten, unter denen die Betroffenen leiden. Dafür bedarf es peripherer Sensoren, welche hyperreagibel auf die Reize reagieren und im Folgenden ins ZNS projizieren, um zerebrale Zentren und deren nachgeschaltete pulmonale Efferenzen zu informieren und kontrollieren. In diesem Zusammenhang wurde in den vergangenen Jahren zunehmend eine persistierende Veränderung der Innervation der Lunge, insbesondere der sensorischer Atemwegsneurone, bei Patienten mit AHR diskutiert, die im Folgenden als neuronale Hyperreagibilität (NHR) bezeichnet wird (Undem und Nassenstein 2009; Barnes 1995, 1996). In einer aktuellen Studie von Tränkner et al. wurde gezeigt, dass eine Population vagaler, sensorischer Neurone, charakterisiert durch die Expression des Kationenkanals *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1), unmittelbar an der Vermittlung der AHR beteiligt ist (Tränkner et al. 2014).

Im nächsten Abschnitt wird diesbezüglich zunächst ein Überblick über die Lungeninnervation gegeben, um anschließend die NHR näher zu erläutern.

1.2 Die Innervation der Lunge

Die Innervation der Lunge erfolgt über ein dichtes Netzwerk von Nervenfasern unterschiedlichen Ursprungs, die sich in einen autonomen, bestehend aus sympathischen, parasympathischen und enterischen Anteil, sowie einen sensorischen Teil gliedert.

1.2.1 Die autonome Innervation

Die sympathische Innervation mit Ursprung in der Seitensäule der oberen Thoraxsegmente des Rückenmarks ist speziesabhängig zu beurteilen (Doidge und

Satchell 1982) und funktionell für die Lungeninnervation von untergeordneter Relevanz. Von größerer Bedeutung sind hingegen die parasympathischen Bahnen mit Ursprung im Ncl. ambiguus und Ncl. dorsalis n. vagi des Hirnstamms. Sie ziehen als präganglionäre Neurone mit dem Nervus vagus zum Brustraum und enden in lokalen intrinsischen Ganglien, die entlang des Tracheobronchialbaums zu finden sind. Hier findet die Umschaltung auf kurze postganglionäre Nervenfasern statt, welche zu den verschiedenen Zielgebieten, wie der glatten Muskulatur der Atemwege, den exokrinen Drüsen und sekretorischen Zellen des Bronchialepithels und den Blutgefäßen ziehen (Belvisi 2002). Ein klassischer Mediator der prä- und postganglionären parasympathischen Neurone ist ACh, welches nach seiner Ausschüttung eine Kontraktion der glatten Muskulatur sowie eine gesteigerte Mukussekretion bewirkt. Außerdem wurden in den intrinsischen parasympathischen Neuronen weitere Mediatoren wie *Vasoactive Intestinal Polypeptide* (VIP) und *Nitric Oxide* (NO) nachgewiesen, die allerdings von einer separaten Population nicht-cholinergener Neurone freigesetzt werden (Kummer et al. 1992b; Fischer A. et al. 1996). Im Gegensatz zur pharmakologischen Wirkung von ACh vermittelt VIP eine Dilatation der Bronchialmuskulatur und zusammen mit NO eine Erweiterung der Blutgefäße (Martling et al. 1990).

1.2.2 Die sensorische Innervation

Die Atemwege und die Alveolen sind mit einem großen Netzwerk aus chemo- und mechanosensorischen Nervenendigungen und Sinneszellen ausgestattet, welche dem Gehirn Informationen über beispielsweise Dehnungsreize zukommen lassen und somit maßgeblich an der reflektorischen Atmungsregulation beteiligt sind (Coleridge und Coleridge 1994; Schmidt und Lang 2007). Die Endigungen entstammen pseudounipolarer Neurone, deren Axone zu großen Teilen mit dem Nervus vagus verlaufen. Über den Nervus laryngeus recurrens erreichen die Äste die Trachea und die Hauptbronchien, als Rami bronchiales nervi vagi die peripheren Atemwege und die Alveolarregion. Die Perikaryen der pseudounipolaren Fasern sind im *Ggl. jugulare et nodosum* (JNG) auf Höhe des Foramen jugulare lokalisiert. Die zentrale Projektion der Information aus den Atemwegen und der Lunge endet im Ncl. tractus solitarii im Hirnstamm.

Eine zusätzliche sensorische Innervation erfolgt über die thorakalen Spinalganglien, welche auch *Dorsal Root Ganglia* (DRG) genannt werden. Diese Afferenzen ziehen

gemeinsam mit den sympathischen Axonen, durchqueren die Grenzstrangganglien und projizieren über die Hinterwurzel zu den Laminae I und II der Substantia gelatinosa im Hinterhorn des Rückenmarks. Ihre Zellkörper sind in den Spinalganglien lokalisiert (Dalsgaard und Lundberg J.M. 1984; Kummer et al. 1992a).

Nach ihren elektrophysiologischen und funktionellen Eigenschaften lassen sich die pulmonalen Afferenzen in drei Klassen untergliedern:

Die *Slowly Adapting Stretch Receptors* (SARs) sind myelinisierte A α - und A β -Fasern, die sich durch eine schnelle Leitungsgeschwindigkeit auszeichnen und hauptsächlich in der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien enden (Widdicombe, 1982). Ihre Aufgabe liegt in der Regulation und Kontrolle der Atemmechanik sowie des Bronchialmuskeltonus. Des Weiteren sind sie an dem vor Überdehnung schützenden Hering-Bräuer-Reflex beteiligt (Widdicombe 1954).

Die *Rapidly Adapting Stretch Receptors* (RARs) sind myelinisierte A δ -Fasern, die sowohl das respiratorische Epithel als auch die glatte Atemwegsmuskulatur innervieren (Widdicombe, 1982), in großer Dichte vor allem aber in den oberen, großen Atemwegen zu finden sind (Mortola et al. 1975). Durch ihre sub- bzw. intraepitheliale Lage sind sie besonders zugänglich für chemische und mechanische Reizstoffe und nehmen dadurch eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von Schutzreflexen wie z.B. Husten ein (Widdicombe 2003; Schmidt und Lang 2007; Mortola et al. 1975).

C-Faser-Neurone, die dritte Klasse der sensorischen Neurone, sind nozizeptive Fasern und leiten die Erregung aufgrund ihrer unmyelinisierten Axone sehr langsam weiter (<1m/s) (Coleridge und Coleridge 1984). Entsprechend ihrer Erreichbarkeit von chemischen Stimulantien, welche entweder in die bronchialen oder pulmonalen arteriellen Gefäße injiziert wurden, konnte eine Unterscheidung der C-Fasern vom bronchialen und vom pulmonalen Typ getroffen werden (Coleridge und Coleridge 1977). Die chemosensiblen, freien Nervenendigungen der pulmonalen C-Fasern befinden sich in der Alveolarregion (Belvisi 2003). Sie lösen bei Erhöhung des Extrazellulärvolumens im juxtakapillären Interstitium der Alveolarsepten den sog. juxtakapillären Reflex (J-Reflex) aus. Dieser äußert sich in einer massiven Hemmung der Inspiration und einer starken Aktivierung der kardialen Vagusneurone, was zu den Symptomen Bradykardie, Hypotension und Apnoe, gefolgt von einer flachen, schnellen Atmung führen kann (Coleridge und Coleridge 1984; Schmidt und Lang 2007; Belvisi 2003). Die Endigungen der bronchialen C-Faser-Neurone sind in den interzellulären Spalten des respiratorischen Epithels zu finden. Ihre Erregung löst ähnliche Reaktionen, aber zusätzlich auch

Bronchokonstriktion, Plasmaextravasation und eine gesteigerte Schleimproduktion aus. Des Weiteren kann Husten auftreten (Coleridge und Coleridge 1984; Belvisi 2003). Die C-Faser-Neurone sind für deren Chemosensitivität gegenüber Capsaicin, ein in der Chillischote erhaltenes Alkaloid, bekannt. Dieses vermittelt seine Antwort über den membrangebunden Kationenkanal TRPV1, welcher teilweise an Nervenendigungen der C-Faser-Neurone zu finden ist (Caterina et al. 1997; Kollarik et al. 2003). TRPV1 wird jedoch nicht nur durch Capsaicin, sondern auch durch eine Vielzahl endogener Substanzen, wie Arachidonsäurederivate und eine erhöhte Wasserstoffionenkonzentration, oder Autacoide, wie Prostaglandin E2, aktiviert. Auch Veränderungen der Umweltbedingungen, wie starke Temperaturerhöhungen, stimulieren den Kationenkanal (Jia und Lee 2007). Ein weiterer Rezeptor der TRP-Kanal-Familie, welcher in den Endigungen sensibler C-Faser-Neurone exprimiert wird, ist TRP-Subfamily A, Member 1 (TRPA1). Er wird nicht durch Capsaicin, jedoch durch andere Substanzen wie Zimtaldehyd, Allicin und Allylisothiocyanat, die aktiven Bestandteile von Senföl, Wasabi und Meerrettich, aktiviert (Bandell et al. 2004). Aber auch für TRPA1 wurden weitere endogene und exogene Stimulanzen identifiziert. Unter anderem stellen reaktive Sauerstoffspezies und Lipidoxidationsprodukte, wie das 4-Hydroxy-2-nonenal, das im Rahmen von inflammatorischen Prozessen oder oxidativem Stress entsteht, endogene TRPA1-Agonisten dar (Taylor-Clark et al. 2009; Trevisani et al. 2014). Aber auch Umweltirritanzen wie Ozon, Chlor und Kälte oder das toxische Acrolein, das u.a. in Tränengas, Autoabgasen und Zigarettenrauch enthalten ist, beziehungsweise als Nebenprodukt bei Chemotherapien anfallen kann, können selektiv den TRPA1-Kanal stimulieren (Taylor-Clark und Udem 2010; Bautista et al. 2006). Die Stimulation der chemosensitiven C-Faser-Neurone führt zu einer nach zentral gerichteten Informationsübermittlung in Form von Aktionspotenzialen an den Ncl. tractus solitarii im Hirnstamm. Von hier aus wird die Information über synaptische Verbindungen an andere Zentren weitergeleitet und verarbeitet. Dazu gehören zum Beispiel das Hustenzentrum sowie der Ncl. ambiguus und Ncl. dorsalis nervi vagi, aus denen die parasympathischen Bahnen entspringen, die dann den Tonus der Atemwegsmuskulatur und die Mukussekretion bestimmen (Udem und Nassenstein 2009; Udem und Carr 2002). Abgesehen von ihrer afferenten Funktion können C-Faser-Neurone nach Stimulation aber auch in Nervenvarikositäten gespeicherte pro-inflammatorische Neuropeptide in der Bronchialschleimhaut freisetzen. Es wird diskutiert, dass sich der lokale Reflex dann antidrom im Sinne eines sich amplifizierenden Mechanismus auf die afferenten

Kollateralen ausbreitet und die Entleerung der Mediatoren, zu denen vornehmlich das *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP), Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) gehören, vermittelt. Diese efferente Eigenschaft sensibler Neurone wurde von Barnes et al. 1986 auch als Axonreflex beschrieben. Die freigesetzten Mediatoren sind potente Induktoren von Bronchokonstriktion, Vasodilatation mit Plasmaextravasation und Bronchialödem sowie einer gesteigerten Mukussekretion. Zusätzlich wirken sie chemotaktisch auf Entzündungszellen und bewirken damit insgesamt die sogenannte neurogene Entzündung (Swert und Joos 2006; Barnes 1986).

1.3 Die neuronale Hyperreagibilität

Wie bereits beschrieben, wird bei der NHR von einer Fehlregulation sensorischer Atemwegsneurone im Rahmen einer allergischen Atemwegsentzündung ausgegangen. Die Betrachtung des Spektrums der Faktoren, die sensorische C-Fasern aktivieren, im Zusammenspiel mit den durch lokale und axonale Reflexe ausgelösten Effekten, drängt den Verdacht auf, dass diese Neurone eine bedeutende Rolle in der NHR tragen. Untermuert wird diese Annahme durch Studien, die zeigen, dass im Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung die Capsaicinprovokation atemphysiologische Veränderungen wie eine verstärkte Bronchokonstriktion und eine verlängerte Pause vor der Ausatmung (dem Hustenäquivalent der Maus) nach sich ziehen (Nassenstein et al. 2006b; Nassenstein et al. 2007), und dass Menschen mit Asthma bronchiale unter Capsaicin-Inhalation einen stärkeren Hustenreiz aufweisen als gesunde Kontrollen (Chung und Pavord 2008). Endgültige Hinweise liefern die aktuellen Daten der bereits erwähnten Studie von Tränkner et al.. In dieser Studie wurden durch selektive Zellablation via Diphtherie-Toxin vagale TRPV1-exprimierende Zellen in Ovalbumin (OVA)-sensibilisierten und provozierten Mäusen ausgeschaltet. Anhand von funktionellen Messungen der Atemwegswiderstände nach ACh-Provokation wurde demonstriert, dass diese Tiere, im Vergleich zu Wildtyp-Tieren, trotz nachweislich bestehender OVA-induzierter Immunantwort (gesteigerte Produktion Allergen-spezifischer IgE und Leukozytenakkumulation mit Eosinophilie in der bronchoalveolären Lavage (BAL)) keine Atemwegshyperreagibilität entwickelten. Mit dem Wissen, dass sensorische C-Faser-Neurone des JNG eine essenzielle Komponente in der Entstehung der AHR darstellen, wurde weiterhin gezeigt, dass die unmittelbare Stimulation dieser sensorischen Neurone durch den selektiven TRPV1-Agonisten Capsaicin in Mäusen mit

OVA-induzierter Atemwegsinflammation zu einer Potenzierung der Bronchokonstriktion nach ACh-Provokation führt. Dieser Effekt blieb in nicht sensibilisierten Mäusen ohne allergische Atemwegsinflammation interessanterweise aus (Tränkner et al. 2014).

Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass sensorische Neurone durch die endogenen Entzündungsmediatoren, die im Asthma verstärkt gebildet werden sensibilisiert, bzw. in ihren Prozessen beeinflusst werden können. Ein Beispiel für ein Bindeglied zwischen Nerven- und Immunsystem sind z.B. die Neutrophine wie der *Nerve Growth Factor* (NGF) oder der *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF). Für diese wurden erhöhte Spiegel in der BAL nach Allergenprovokation sensibilisierter Mäuse beschrieben (Braun et al. 1999b; Braun et al. 1998). Gleichzeitig können sie, indem sie die Neuropeptidbildung fördern und deren Freisetzung triggern, Einfluss auf sensorische C-Faser-Neurone nehmen (Lindsay und Harmar 1989; Donnerer et al. 1992; Nawa et al. 1994; Braun et al. 1999a). Inflammatorische Prozesse können die Exzitabilität sensorischer Neurone erhöhen und Einfluss auf die Genexpression nehmen, wodurch langfristige phänotypische Veränderungen der Neurone entstehen (Fischer et al. 1996; Riccio et al. 1996; Udem und Nassenstein 2009). Es ist anzunehmen, dass die Entwicklung der NHR primär im unmittelbaren Zusammenhang mit der Atemwegsentzündung steht (Murphy et al. 1986; Nassenstein et al. 2007) und im Verlauf eine entzündungsunabhängige Autonomie entwickelt (Cockcroft und Davis 2006; Tränkner et al. 2014).

1.4 Die *Fibroblast Growth Factor*-Familie

1.4.1 *Fibroblast Growth Factors*

Die Familie der *Fibroblast Growth Factors* (FGFs) ist eine Gruppe von strukturverwandten Polypeptiden, welche nach heutigem Stand in Vertebraten 22 distinkte Mitglieder umfasst und eine Schlüsselposition in der Kontrolle zahlreicher biologischer Funktionen wie Zellproliferation, -differenzierung und -migration einnehmen (Itoh 2007; Ornitz und Itoh 2001). Die Prototypen der FGF-Familie, FGF1 (*acidic*) und FGF2 (*basic*), wurden erstmals vor ca. 40 Jahren aus bovinem Hirn und der Hypophyse isoliert und dessen mitogene Effekte auf kultivierte Fibroblasten aufgezeigt (Gospodarowicz 1975; Gospodarowicz et al. 1978). Im Verlauf der Zeit wurden immer wieder neue Proteine identifiziert, denen eine wachstumsfördernde Eigenschaft und eine Homologie mit FGF1 und FGF2 zugeschrieben werden konnte.

Anhand phylogenetischer Analysen können die FGFs in 7 Subfamilien, jeweils 3 bis 4 Mitglieder umfassend, untergliedert werden. Diesen Subfamilien ist gemein, dass sie in der Regel eine ähnliche Aminosäurestruktur aufweisen, die gleichen Rezeptoren binden und zu einem ähnlichen, jedoch nicht identischen Expressionsmuster tendieren (Itoh und Ornitz 2010). Die Expression der FGFs ist zeitlich und gewebespezifisch strikt reguliert. Eine tragende Rolle wird ihnen in der embryonalen Entwicklung zugeschrieben. Beispielsweise sind sie für die Induktion der Gastrulation und der Neurulation notwendig und haben Bedeutung in der Organogenese, einschließlich der der Lunge (Goldfarb 1996; Hines und Sun 2014). Im adulten Organismus wirken sie als homöostatische Faktoren und übernehmen u.a. bedeutende Aufgaben in Gewebereparaturen, Wundheilungsprozessen und der Angiogenese (Ornitz und Itoh 2001).

Ein Charakteristikum der FGFs ist deren Affinität zu den Glykosaminoglykanen Heparin und Heparinsulfatproteoglykan (HSPGs). Diese sind ubiquitäre Bestandteile der extrazellulären Matrix und kommen gebunden an der Plasmamembran von Zellen vor. Sie werden als die niedrig affine Rezeptorklasse der FGFs bezeichnet, wobei ihnen wichtige physiologische Aufgaben zugesprochen werden, ohne dass sie dabei selbstständig eine Signalkaskade in Gang setzen. Man geht davon aus, dass die Bindung der FGFs an die HSPGs zu einer verbesserten FGF-Verfügbarkeit *in vivo* führt, da auf diese Weise die sezernierten Wachstumsfaktoren zum einen verstärkt in der räumlichen Nähe der FGFR verbleiben (Flaumenhaft et al. 1990) und andererseits vor proteolytischem Abbau und Hitzedenaturierung geschützt werden (Gospodarowicz und Cheng 1986). So entsteht eine Art extrazelluläres, lokales Reservoir stabiler, aber inaktiver FGFs.

1.4.2 Fibroblast Growth Factor-Rezeptoren

Die meisten FGFs vermitteln ihre Effekte über die Interaktion mit einem der vier in Vertebraten identifizierten FGF-Rezeptoren (FGFR1-4). Diese gehören der Klasse der Rezeptor-Tyrosinkinase an. Der Aufbau des Rezeptors ist charakterisiert durch eine extrazelluläre Bindungsdomäne, eine transmembrane sowie eine cytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität und regulatorischen Sequenzen für Ziel- und Adapterproteine (Schlessinger 2000).

Der Prototyp der extrazellulären Domäne des FGFR setzt sich aus drei immunglobulinähnlichen Domänen (D1-D3) zusammen, deren Schleifenform durch Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinen aufgebaut wird. Die Schleifen sind

untereinander durch kurze Linkersequenzen getrennt. Ausschließlich die D2 und D3 sowie deren Linkersequenz sind unmittelbar an der Ligandenbindung beteiligt (Plotnikov et al. 1999; Schlessinger 2000). Diese weisen aufgrund der Spezifität zu den verschiedenen Liganden die größten strukturellen Unterschiede auf. Neben den vier beschriebenen FGF-Rezeptor-Subtypen (FGFR1-4) wird die Vielfalt der Rezeptoren durch das Prinzip des alternativen Spleißens erweitert. Das bedeutsamste Spleißevent ist maßgeblich an der Determination der Ligandenbindungsspezifität beteiligt, indem die C-terminale Hälfte der immunglobulinähnlichen Domäne 3 funktionsrelevant variiert wird und dadurch unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber den FGFs geschaffen werden (Johnson et al. 1991). Dem Mechanismus liegt der alternative Gebrauch drei verschiedener Exons innerhalb der genomischen Region zugrunde, die die C-terminale Hälfte der immunglobulinähnlichen Domäne 3 kodieren. Dabei ist das Exon IIIa am 5' Ende, das Exon IIIb in der Mitte und Exon IIIc am 3' Ende lokalisiert (Werner et al. 1992; Itoh 2007). An die hydrophobe, transmembrane Domäne schließt sich der zytoplasmatische Abschnitt der FGF-Rezeptoren an. Die zytoplasmatische Domäne ist im Vergleich zur extrazellulären Domäne bei FGFR1-4 weitestgehend homolog. Daraus resultiert, dass die weitergeleiteten Signalwege untereinander sehr ähnlich sind (Johnson und Williams 1993). Die zytoplasmatische Domäne besteht aus einem juxtamembranen Abschnitt, einer zweigeteilten, katalytisch wirksamen Tyrosinkinasedomäne, TK1 und TK2, und einem C-terminalen Schwanz (Johnson und Williams 1993) (Abb.1.1). Als aktives Zentrum ist dabei die ATP-bindungstellentragende Kinasedomäne zu betrachten, welche nach extrazellulärer Ligandenbindung letztendlich die Phosphorylierung der Tyrosinreste von Substratproteinen im Zellinneren vermittelt (Schlessinger 2000; Yarden und Ullrich 1988).

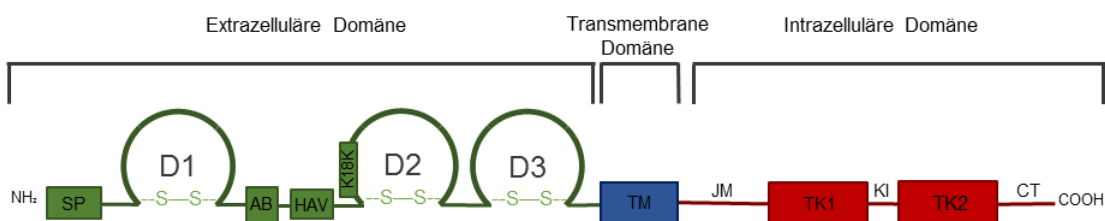


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des FGF-Rezeptor-Aufbaus

D1-D3 = immunglobulinähnliche Domänen, SP = Signalpeptid, AB = *acid box*, HAV = Histidin-Alanin-Valin-Sequenz, K18K = Heparinbindungsstelle, TM = transmembrane Domäne, TK1/2 = Tyrosinkinasedomänen, JM = juxtamembrane Domäne, KI = Kinase-Insert, CT = zytoplasmatischer Schwanz. Modifiziert nach (Johnson et al. 1990; Eswarakumar et al. 2005; Pasumarthi et al. 1995).

1.5 FGFs und Asthma bronchiale

In einer Studie von Redington et al. aus dem Jahr 2001 wurde ein erhöhter FGF2- Spiegel in der BAL von Patienten mit atopischem Asthma gegenüber der gesunden Kontrollgruppe festgestellt (Redington et al. 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bereits 10 Minuten nach Allergenexposition bei Patienten mit allergischen Asthma der FGF2-Spiegel in der BAL um ein fünffaches ansteigt (Redington et al. 2001). Gestützt wird diese Theorie von einer aktuellen Studie, in der das Zytokin FGF2 als ein neuer Biomarker für das *Airway Remodeling* betrachtet wird. Demnach kann ein Anstiegs des FGF2-Spiegels im Sputum von Asthmatikern gegenüber gesunden Kontrollen nachgewiesen werden, der sogar mit dem Schweregrad des Asthmas sowie der Einschränkung der Lungenfunktion (Tiffeneau-Index) zu korrelieren scheint (Bissonnette et al. 2014). Immunhistochemische, quantitative Analysen an Gewebeschnitten humaner Lungen von Asthmatikern und gesunden Kontrollen weisen auch intrazellulär auf eine verstärkte Expression von FGF2 im Bronchialepithel im Rahmen der allergischen Atemwegsinflammation hin (Shute et al. 2004).

In Bezug auf das *Airway Remodeling* ist FGF2, aber auch andere FGFs, nicht zuletzt aufgrund der mitogenen Effekte auf Muskelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen von potenzieller Relevanz (Burgess und Maciag 1989). Es existieren *in vitro* Studien, die eine direkte und indirekte proliferationsfördernde Wirkung von FGF2 auf die glatte Bronchialmuskulatur belegen (Zou et al. 2008; Bossé et al. 2006). Außerdem zeigt sich eine Korrelation zwischen der FGF2-Expressionsstärke und der Vaskularisierung in der Bronchialschleimhaut von Asthmatikern (Hoshino et al. 2001). Die beschriebenen Pathologien führen in ihrer Gesamtheit zu einer Verdickung der Bronchialwand, dem Charakteristikum des *Airway Remodelings*.

Inwieweit FGF2, aber auch andere Mitglieder der FGF-Familie, ebenso Einfluss auf die Atemwegshyperreagibilität, im Speziellen die NHR, nehmen können, ist bislang ungeklärt. Wie bereits beschrieben, wird den sensorischen C-Faser-Neuronen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der NHR zugeschrieben. Die bronchoepitheliale Basalmembran stellt aufgrund ihres hohen Gehalts an Proteoglykanen wie Perlecan, die verschiedene FGFs, u.a. FGF2, extrazellulär binden können (Aviezer et al. 1994), ein Reservoir für die Wachstumsfaktoren dar, durch die die Nervenendigungen der sensorischen Neurone direkt verlaufen (Watanabe et al. 2005). Diese enge räumliche Lagebeziehung könnte die Grundlage für eine Fehlregulation in der Interaktion zwischen

FGFs und Nervensystem beim Asthma bronchiale darstellen.

Voraussetzung dafür ist, dass FGFs und ihre Rezeptoren von den entsprechenden Systemen exprimiert werden. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit anhand des Mausmodells für allergische Atemwegsentzündung folgende Fragen beantwortet werden:

1. Exprimieren bronchopulmonale, vagale C-Faser-Neurone FGF-Rezeptoren, und wird deren Expressionsmuster durch die allergische Atemwegsinfektion beeinflusst?
2. Welche Spleißvariante der FGF-Rezeptoren wird in bronchopulmonalen, vagalen C-Faser-Neuronen exprimiert?
3. Welche FGFs werden von der Mauslunge exprimiert, und wie wird deren Expression bei der allergischen Atemwegsinfektion reguliert?
4. Welche funktionellen Einfluss üben FGFs auf sensorische Neurone aus?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien allgemein

Die Materialien, welche für die Durchführung der einzelnen Methoden benötigt wurden, sind bei der Beschreibung der entsprechenden Methode gesondert aufgeführt.

Produkte, die bei verschiedenen Methoden gebraucht wurden, sind im Folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

2.1.1 Geräte

- Analysewaage R200D, Sartorius AG, Göttingen, D
- Direct-Q™ Reinstwasseraufbereitungs-System, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
- Magnetrührer, IKA®, Staufen, D
- Mini-Zentrifuge Sprout, Biozym GmbH, Hessisch Oldendorf, D
- Pipetboy mini, INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, D
- Pipetten, Pipetman (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Gilson, Middleton, WI, USA
- Waage MXX-612, Denver Instrument GmbH, Göttingen, D
- Vortexmischer MS2 Minishaker, IKA®, Staufen, D

2.1.2 Reagenzien

- Ampuwa®, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Cellstar® Tubes (15 ml, 50 ml), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
- Deckgläser (24 × 60 mm, Glasdicke 0,13-0,17 mm), R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Filter Tips (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
- Handschuhe, Nobaglove®-Latex, Noba Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG, Wetter, D
- Handschuhe, purple Nitrile-Xtra, Kimberley-Clark, Dallas, TX, USA
- Objektträger (25 × 75 × 1 mm), R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml), Eppendorf AG, Hamburg, D/ Sarstedt, Nümbrecht, D
- Sterile Einwegkanülen, Braun, Melsungen, D
- TipOne® Filterspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl), STARLAB, Hamburg, D

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Studie wurde an 6 bis 12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ Raumtemperatur, $55\% \pm 1\%$ Luftfeuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus. Die Mäuse erhielten OVA-freies Futter und Wasser *ad libitum*. Die Haltung und Behandlung der Tiere wurde unter Erlaubnis des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt (V54-19c20-15(1) GI 20/23 Nr. 37/2010), (V54-19c20 15h 01 GI 20/23 Nr. 29/2013).

2.2.1 Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsentzündung

Die Mäuse wurden nach einem etablierten Protokoll (Herz et al. 1996; Nassenstein et al. 2006a), bestehend aus einer Sensibilisierungsphase mit anschließender Aerosolexposition, behandelt. Auf diese Weise wurde in den Atemwegen der Maus eine allergische Entzündung provoziert, sodass Zellmaterial für die Versuchsreihen gewonnen werden konnte. Als Allergen wurde das Protein OVA verwendet.

2.2.1.1 Sensibilisierung durch Allergenapplikation

Material:

- Ovalbumin, Grad VI, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Aluminiumhydroxid (Imject-Alum Adjuvant), Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT

Die Sensibilisierung der Versuchstiere fand an den Tagen 1, 14 und 21 durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von OVA statt. Es wurden jeweils 10 μg OVA absorbiert an 1,5 mg Aluminiumhydroxid, gelöst in 200 μl PBS, injiziert.

2.2.1.2 Allergenchallenge

Material:

- Ovalbumin, Grad V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT
- Plexigaskammer, Med. Hochschule Hannover, Hannover, D
- Düsenvernebler Pari LC Star, Pari GmbH, Starnberg, D
- Vakuumpumpensystem, Pfeiffer Vacuum, Wetzlar, D

Im Anschluss an die Sensibilisierung erfolgte eine Allergen-Exposition in Form eines OVA-Aerosols. Zu diesem Zweck inhalierten die Tiere an den Tagen 27, 28 und 35 in einer abgedichteten Plexigaskammer für 20 Minuten vernebeltes 1%iges OVA (10 mg/ml PBS). In Abhängigkeit der Versuchsgruppengröße befanden sich zeitgleich zwischen 3 bis 8 Mäuse in der Expositionskammer. Das Allergen-Aerosol wurde mit einem Volumenstrom von ca. 20 l/min in die Kammer gegeben und auf der gegenüberliegenden Seite mit einem Unterdruck (22 l/min) abgesaugt. Der Druckausgleich zur Vorbeugung eines Vakuums erfolgte über ein im Zustrom zwischengeschaltetes T-Stück (Abb. 2.1). Die Tröpfchengröße des Aerosols betrug ca. 1 µm und war damit atemwegsgängig. Bei der Kontrollgruppe wurde alternativ reines PBS-Aerosol verwendet. Die Tiere, welche eine OVA-Aerosol-Exposition erhalten hatten, werden im Folgenden zusammenfassend als OVA-Gruppe, und die mit PBS behandelten Tiere als PBS-Kontrollgruppe bezeichnet.

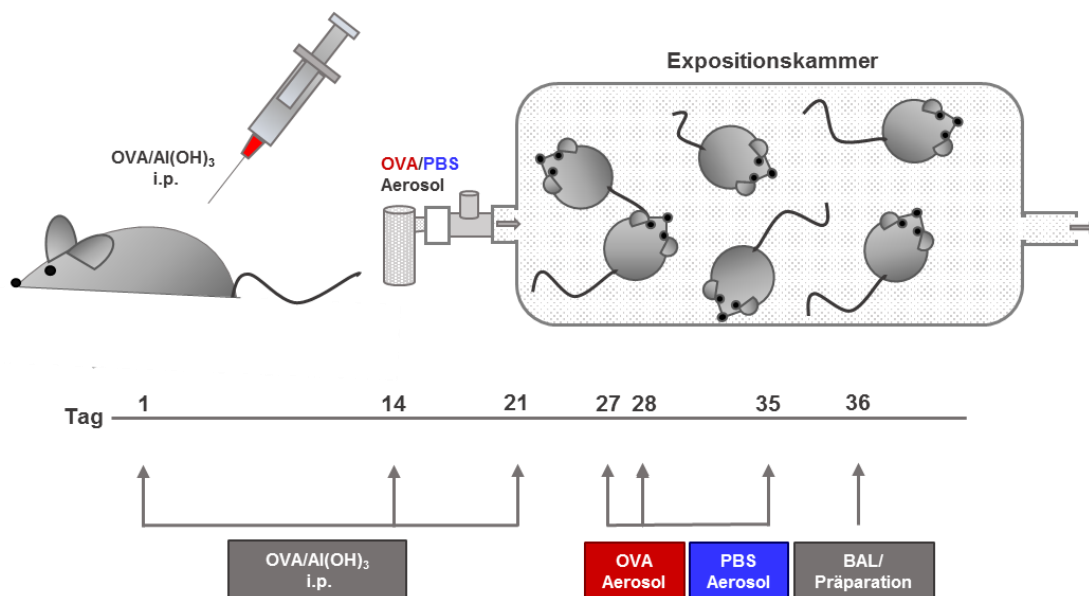


Abb. 2.1: Behandlungsprotokoll des Mausmodells der akuten allergischen Atemwegsentzündung
Eine allergische Entzündung wurde durch die i.p. Injektion von OVA und Aluminiumhydroxid mit anschließender OVA-Aerosol-Exposition induziert. Die entsprechende Kontrollgruppe erhielt anstelle des OVA-Aerosols ein PBS-Aerosol.

2.2.2 Retrogrades Markieren von bronchopulmonalen Afferenzen

Material:

- Ketaminhydrochlorid 10% (100 mg/ml), bela-pharm GmbH & Co. KG, Vechta, D
- Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, D
- 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI), Life Technologies (Invitrogen), Carlsbad, CA, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT

Lösungen und Puffer:

DiI-Stammlösung 1%

DiI	10 mg
DMSO	1 ml

DiI-Lösung 0,1%

DiI-Stammlösung 1%	5 µl
PBS	45 µl

Das intratracheale *Tracing* fand am Tag 29 des Behandlungsprotokolls statt. Zum Markieren der bronchopulmonalen Afferenzen wurde der fluoreszierende Farbstoff DiI verwendet. Die 1%ige DiI-Stammlösung wurde mit PBS 1:10 verdünnt. Um ein Auskristallisieren von DiI zu verhindern, fand dieser Vorgang im Ultraschallbad statt. Die Mäuse wurden mittels i.p. Injektion von 2 mg Ketamin und 0,2 mg Xylazin narkotisiert und anschließend mittels eines Kunststoffkatheters einer Venenverweilkanüle orotracheal intubiert. Über diesen Zugang wurde anschließend die 0,1%ige Farbstofflösung in die Trachea appliziert. Durch retrograden axonalen Transport gelangte der Farbstoff in die vagalen Ganglien, sodass sich die Perikaryen der lungeninnervierenden Nervenzellen bei einem Absorptionsmaximum von 549 nm und einem Emissionsmaximum von 565 nm fluoreszierend darstellten.

2.2.3 Tierschutzgerechte Tötung und Präparation

Material:

- Isofluran, Baxter, Unterschleißheim, D
- Präparationsmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

Die Tötung der Tiere erfolgte entsprechend des Behandlungsprotokolls am Tag 36. Zunächst wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert und die Narkosetiefe durch Kontrolle von Reflexen, z.B. Schmerzreiz an der Pfote mit Zucken der Extremitäten, überprüft. Zum Herbeiführen des Todes wurde die Bauchaaorta durchtrennt. Anschließend wurden die Mäuse zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials präpariert. Zunächst wurde eine BAL durchgeführt (s. 2.3.1). Weiterhin wurde das JNG frei präpariert und vom umliegenden Gewebe losgelöst. Als Leitstruktur diente der Nervus vagus. Der Nerv wurde am rostralen und kaudalen Ende des Ganglions durchtrennt und das isolierte Ganglion entnommen. Rechter und linker Lungenlappen wurden frei präpariert und entnommen.

2.3 Untersuchungen der allergischen Atemwegsinfektion

2.3.1 Bronchoalveoläre Lavage

Material:

- Venenverweilkanüle, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
- Dulbecco's PBS (steril), PAA Laboratories GmbH, Pasching, AUT

Bei der BAL werden durch eine Spülung der Lunge mit PBS Zellmaterial und lösliche Bestandteile aus den Atemwegen und Alveolen aspiriert und somit für zytologische Untersuchungen zugänglich gemacht.

Mithilfe der BAL sollte anhand der absoluten Gesamtzellzahl (GZZ) und der relativen Immunzellendifferenzierung nachgewiesen werden, dass im Rahmen des Behandlungsprotokolls erfolgreich eine bronchopulmonale Entzündung induziert wurde. Dafür wurde die Trachea des toten Tieres vorsichtig freigelegt und eine gebogene Venenverweilkanüle unter Sichtkontrolle eingeführt. Über diese wurde nacheinander zweimal je 0,8 ml PBS (4°C) über die Atemwege in die Lunge injiziert, aspiriert und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. Das gewonnene Gesamtvolumen wurde notiert und die BAL bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis aufbewahrt.

2.3.1.1 Absolute Gesamtzellzahlbestimmung

Material:

- Neubauer Zählkammer improved brightlight, Laboroptik, Lancing, UK
- Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Lichtmikroskop Leica DM IRB, Leica, Wetzlar, D

Die BAL wurde für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment nach Durchmischung mit PBS auf ein Endvolumen von 250 µl bei der Kontrollgruppe und, aufgrund der höheren Zelldichte, auf 500 µl bei der OVA-Gruppe aufgefüllt. Zehn µl der Zellsuspension wurden in eine Neubauer Zählkammer gegeben und mikroskopisch 4 große Eckquadrate ausgezählt. Hierbei wurden alle Leukozyten registriert; Erythrozyten und Epithelzellen wurden nicht berücksichtigt. Aus den Auszählungen aller Quadranten der Zählkammer wurde ein Durchschnittswert gebildet. Dieser Durchschnittswert entsprach $x \times 10^4$ Zellen pro Milliliter der Zellsuspension. Da das Zellpellet zuvor mit nur 500 µl bzw. 250 µl PBS statt einem Milliliter suspendiert wurde, wurde der pro Milliliter ermittelte Durchschnittswert entsprechend halbiert bzw. geviertelt um die absolute GZZ zu bestimmen.

2.3.1.2 Zelldifferenzierung

Material:

- Heraeus® Zyto-System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Zentrifuge, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Methanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- May-Grünwalds Eosin-Methylenblaulösung, Merck, Darmstadt, D
- Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblaulösung, Merck, Darmstadt, D
- Entellan, Merck, Darmstadt, D
- Lichtmikroskop Leica DM IRB, Leica, Wetzlar, D

Zur qualitativen Differenzierung der Zellen eignet sich die Färbung nach Pappenheim. Dafür wurden über die Zentrifugier-Dekantier-Methode Zytospots angefertigt. Jeweils 100 µl der Zellsuspensionen (ca. 10⁵ Zellen enthaltend) wurden auf einen Objektträger pipettiert und anschließend bei 500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Zytospot anschließend unmittelbar für 5 Minuten in Methanol fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Zellen nach Pappenheim angefärbt. Dieses Verfahren eignet sich aufgrund des sich unterschiedlich darstellenden Zytoplasmas zur Differenzierung der einzelnen Blutzellen.

Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Die Zytospots wurden zunächst für 5 Minuten in May-Grünwald-Färbelösung gefärbt und anschließend für 2 Minuten in PBS gespült. Darauf wurden sie für 15 Minuten in Giemsa-Färbelösung (1:20 verdünnt in Aqua. bidest) gegengefärbt. Zuletzt wurden die Zytospots mit Aqua bidest gespült, getrocknet und mit Entellan eingedeckt. Schließlich konnten die Zellen unter dem Lichtmikroskop bei vierzigfacher Vergrößerung histologisch differenziert und ausgezählt werden. Es wurden aus 5 Sichtfeldern je 100 Zellen differenziert. Hierbei wurde zwischen Makrophagen, Lymphozyten sowie Neutrophilen und Eosinophilen unterschieden.

2.3.2 Histologie

Intrapulmonale strukturelle Umbauprozesse, welche sich im Rahmen der allergischen Atemwegsinflammation ergeben, wurden anhand von histologischen Färbungen formalinfixierter, in Paraffin eingebetteter Lungengewebe beurteilt und mit den Schnittpräparaten der gesunden Kontrollgruppe verglichen.

2.3.2.1 Fixierung, Entwässern und Einbetten in Paraffin

Material:

- Paraformaldehyd (PFA), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Ethanol (EtOH), Berkel AHK, Ludwigshafen, D
- 2, 2 Dimethoxypropan (DMP), Merck, Darmstadt, D
- Paraffinöl und Paraffin (42°C), Merck, Darmstadt, D
- Paraplast (57°C), Vogel, Gießen, D
- Phosphatpuffer (s. Immunhistochemie)

Zur Fixation wurden die Lungenflügel mit in PBS gepuffertem, 4%igen PFA instilliert, zurechtgeschnitten und nach folgendem Protokoll in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, eingebettet und mit Hilfe einer Silikonform, kleine, das Gewebe beinhaltende Paraffinquader gegossen.

Spülen:

1 × 0,1 M Phosphatpuffer für 24 h
2 × in Aqua bidest für 1 h

Entwässern:

2 × EtOH 70% für 1 h
1 × EtOH 70%/DMP (1:1) für 1 h
1 × EtOH 70%/DMP (1:1) für 3 h
1 × DMP für 1 h
1 × DMP über 12 h

Zwischenmedium:

2 × DMP/Paraffinöl für 1 h
1 × Paraffinöl für 2 h
1 × Paraffinöl über 48 h

Einbettung

2 × Paraffinöl/Paraffin (42°C) für 2 h
2 × Paraffin (42°C) für 2 h
1 × Paraffin (42°C) für 12 h
2 × Paraplast (57°C) für 2 h

Ausblocken

2.3.2.2 Anfertigen von Paraffinschnitten

Material:

- Schlittenmikrotom (20249), R. Jung AG, Heidelberg, D
- SuperFrost Plus Objektträger R. Langenbrinck, Emmendingen, D

Nach der Einbettung wurde aus dem paraffinierten Gewebe mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Dafür wurden die Objektträger zuvor mit einem Tropfen Aqua bidest versehen. Die Paraffinschnitte wurden mit einem feuchten Pinsel aufgenommen und auf den nassen Objektträger transferiert. Darauf wurde der Objektträger für kurze Zeit auf eine Wärmebank aufgebracht, sodass das Wasser verdunsten und sich die Schnitte auf dem Objektträger strecken konnten.

2.3.2.3 Histologische Färbungen

Material:

- Xylol, VWR Chemicals BDH Prolabo, Fontenay-sous-Bois, F
- Ethanol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Entellan, Merck, Darmstadt, D

Für die histologischen Färbungen wurden die Objektträger in Färbeküvetten gestellt.

Alle Gewebeschnitte wurden zunächst für 3-5 Minuten wie folgt entparaffiniert:

3 × Xylol → 2 × Ethanol 100% → 1 × Ethanol 96% → 1 × Ethanol 70% → Aqua bidest

Nach dem Färben wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und geklärt:

1 × Ethanol 70% → 1 × Ethanol 96% → 1 × Ethanol 100% → Xylol

Das Medium wurde gewechselt, sobald keine Schlierenbildung auf dem Objektträger zu erkennen war (ca. alle 2 Minuten). Zuletzt wurden die Schnitte mit Hilfe des Eindeckmediums Entellan mit einem Deckgläschen versehen und 24 Stunden getrocknet.

2.3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Material:

- Hämatoxylin, Merck, Darmstadt, D
- Natriumjodat, Merck, Darmstadt, D
- Kalium-Aluminiumsulfat, Riedel-De-Haën, Seelze, D
- Chloralhydrat, Riedel-De-Haën, Seelze, D
- Zitronensäure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Eosin, Merck, Darmstadt, D
- Eisessig, Riedel-De-Haën, Seelze, D

Die Hämatoxylin-Eosin-(H.E.)-Färbung setzt sich aus zwei Einzelfärbungen zusammen, für die folgende Ansätze vorbereitet wurden:

Hämalaun nach Mayer (vor Gebrauch filtriert)

1g Hämatoxylin in 1 l Aqua bidest lösen

+ 0,2 g Natriumjodat

+ 50 g Kalium-Aluminiumsulfat × 12 H₂O

+ 50 g Chloralhydrat

+ 1 g Zitronensäure kristallin

Eosin

Eosin Stammlösung 1%ig: 1 g Eosin in 100 ml Aqua bidest lösen

Eosin Gebrauchslösung 0,1%ig: Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest + ein Tropfen Eisessig

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für ca. 5 Minuten in Hämalaun nach Mayer gefärbt, in Aqua bidest gespült und für ca. 10 Minuten unter laufendem lauwarmen Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit Aqua bidest gespült und mit einer 0,1%igen wässrigen Eosinlösung für ca. 1-2 Minuten gegengefärbt. Es folgte ein erneuter Spülvorgang mit Aqua bidest.

2.3.2.3.2 Periodic acid-Schiff-Färbung

Material:

- 1% Perjodsäure, Merck, Darmstadt, D
- Pararosanillin, Merck, Darmstadt, D
- Kaliumpyrosulfit, Merck, Darmstadt, D
- Salzsäure 1N, Merck, Darmstadt, D
- Natriumdisulfit, Merck, Darmstadt, D
- Hämalaun nach Meyer s. 2.3.2.3.1

Im Rahmen dieser Arbeit dient die PAS-Färbung der Darstellung mukusproduzierender Becherzellen im respiratorischen Epithel. Es wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Schiff- Reagenz

- a) 10 g Pararosanillin in 300 ml HCl 1N
 - b) 10 g Kaliumpyrosulfat in 1700 ml Aqua bidest
- a) + b) mischen und lichtgeschützt 24 Stunden reifen lassen

Die Flüssigkeit wird mit 0,3 g Aktivkohle/100 ml versetzt, geschüttelt und dann durch einen Papierfilter filtriert. Das Filtrat muss farblos sein und kann bei + 4°C gelagert werden.

Sulfitwasser

- 100 ml Aqua bidest
+ 5 ml HCl 1N
+ 5 ml Natriumdisulfit 10%

Hämalaun nach Mayer

s. 2.3.2.3.1

Zunächst wurden die Gewebeschnitte für 5 Minuten mit 1%iger Perjodsäure, einem Oxidationsmittel, inkubiert und anschließend dreimal in Aqua bidest gespült.

Darauf folgte die Färbung mit dem Schiff'schen Reagenz für ca. 60 Minuten in einer lichtgeschützten Küvette. Überschüssige Farbe wurde durch eine dreiminütige Sulfitspülung differenziert, entfernt und die Farbe stabilisiert. Anschließend wurden die Präparate für 15 Minuten unter fließenden Leitungswasser gebläut. Nach einmaligen

Spülen mit Aqua bidest erfolgte für ca. 10 Minuten die kontrastreiche Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer. Zum Schluss wurde erneut mit Aqua bidest gespült, 10 Minuten mit Leitungswasser gebläut und wieder mit Aqua bidest gespült.

2.3.2.3.3 Masson-Goldner-Färbung

Material:

- Eisenhämatoxylin, Merck, Darmstadt, D
- Eisenchlorid, Merck, Darmstadt, D
- Salzsäure 1N, Merck, Darmstadt, D
- Säurefuchsin, Merck, Darmstadt, D
- Eisessig, Riedel-De-Haën, Seelze, D
- Azophloxin, Chroma-Gesellschaft Schmidt und Co., Stuttgart- Untertürkheim, D
- Phosphorwolframsäure, Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, MO, USA
- Orange-G, Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, MO, USA
- Lichtgrün, Sigma-Aldrich (Fluka), St. Louis, MO, USA

Die Masson-Goldner-Färbung ist eine Standardfärbung, die insbesondere der Darstellung von Kollagen dient. Es wurden folgende Ansätze vorbereitet:

Eisenhämatoxylin nach Weigert

- a) 1 g Eisenhämatoxylin in 100 ml Ethanol 96%
 - b) 1,16 g Eisenchlorid in 98 ml Aqua bidest
+ 1 ml Salzsäure 25%
- a) + b) vor Gebrauch 1:1 mischen

Ponceau S

- a) 1 g Säurefuchsin in 100 ml Aqua bidest
+ 1 ml Eisessig
 - b) 0,5 g Azophloxin in 100 ml Aqua bidest
+ 0,2 ml Eisessig
 - c) Essigsäure 0,2%
- 8 ml a) + 2 ml b) + 90 ml c)

Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung

- 4 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua bidest lösen
+ 2 g Orange-G

Lichtgrün

- 0,2 g Lichtgrün in 100 ml Aqua bidest lösen
+ 0,2 ml Eisessig

Im ersten Schritt wurden die Schnitte für ca. 3 Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert gefärbt und anschließend für 10 Minuten unter fließendem lauwarmen Leitungswasser gebläut. Darauf folgte die Färbung mit Ponceau-S für 5 Minuten und anschließenden Spülen in 1%iger Essigsäure. Differenziert wurde für ca. 2-3 Minuten in Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung. Anschließend wurde erneut mit 1%iger Essigsäure gespült. Zur Darstellung der kollagenen Fasern erfolgten schließlich die fünfminütige Färbungen der Gewebeschnitte mit Lichtgrün. Zuletzt wurde für 5 Minuten mit 1%iger Essigsäure gespült.

2.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) erfolgte zum einem in Form der *standard* RT-PCR, und zum anderen als *single-cell* RT-PCR. Für diese beiden Methoden waren zwei verschiedenen Formen der Probenaufbereitung notwendig.

2.4.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese bei der *standard* RT-PCR

Zunächst wurde die RNA mithilfe RNA bindender Säulen isoliert und anschließend durch das Enzym Reverse Transkriptase die dazu komplementäre cDNA hergestellt.

2.4.1.1 RNA-Isolation

Material:

- RNeasy RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Hilden, D
- RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, D
- Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, D
- β -Mercaptoethanol, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
- Kugelmühle Retsch MM300 mit Metallkugeln, Retsch, Haan, D
- Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, D

Nach der Präparation wurden die Gewebeproben zur RNA-Stabilisation in ca. 1 ml *RNeasy* bei -20°C gelagert. Zur RNA-Isolation wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen verwendet und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Im ersten Schritt wurde je 1 ml RLT Puffer mit 10 μl β -Mercaptoethanol versetzt. Diese Substanz denaturiert RNasen und verhindert so den Abbau von RNA.

Den gefrorenen Proben wurden jeweils 350 μl des Puffers hinzugegeben. Mit Hilfe einer Metallkugel wurde das Gewebe für 5-10 Minuten bei 30 Hz in der Kugelmühle homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues

Röhrchen pipettiert und mit 350 µl Ethanol 70% vermischt. Das Lysat wurde auf RNA-bindende Säulen übertragen und anschließend bei 10.000 rpm für 1 Minute abzentrifugiert. Der Durchfluss im Sammelgefäß wurde verworfen. Die mit RNA beladenen Säulen wurden anschließend mit 700 µl des Waschpuffers RW1 durch eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm gewaschen. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule in einem neuen Sammelgefäß jeweils zweimal mit 500 µl RPE Puffer gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mittels einminütiger, der zweite mittels zweiminütiger Zentrifugation.

Bevor die RNA im letzten Schritt des Protokolls eluiert werden konnte, wurde die Säule in einem neuen Sammelgefäß eine Minute lang bei 13.000 rpm getrocknet. Die Säulen wurden in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, in die die RNA aufgefangen werden sollte, transferiert. Zum Eluieren wurde auf die Säulen je 30 µl Reinstwasser direkt auf die Membran pipettiert und eine Minute lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die spektralphotometrische Quantifizierung der isolierten RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Sofern die Umschreibung nicht unmittelbar erfolgte, wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.4.1.2 DNase-Verdau und Reverse Transkription

Material:

- Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg, D
- PCR Tube Strips 0, 2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, D
- DNase I (1 U/µl), life technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- 10 × DNase I Reaction Buffer, life technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- EDTA (25 mM, pH 8, 0), life technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- 5 × First Strand Buffer, life technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- dNTPs (100 Mm), Qiagen, Hilden, D
- random hexamer primer, live technologies™ (Applied Biosystems®), Carlsbad, CA, USA
- oligo dTs (0,5 µg/µl), Qiagen, Hilden, D
- Dithiothreitol (0, 1 M), life technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Superscript® II Reverse Transcriptase (200 U/µl), Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA

Um genomische DNA zu eliminieren, wurde die isolierte RNA zunächst einer DNase-Behandlung unterzogen. Für diesen Zweck wurde 1 µg der RNA mit 1 µl DNase-I und 1 µl 10 × DNase-I Reaktionspuffer versetzt und mit H₂O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde bei 25°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der

enzymatische Verdau durch Zugabe von 1 µl EDTA und zehnmütiger Inkubation bei 65°C gestoppt und der Ansatz für 5 Minuten auf 4°C abgekühlt. Nach dem DNase-Verdau erfolgte die enzymatische Umschreibung der mRNA in cDNA. Für die Reverse Transkription wurde ein Master-Mix aus folgenden Komponenten angesetzt:

	pro Probe
5 × First Strand Buffer	4 µl
dNTPs (10 mM of each dNTP)	1 µl
random hexamer primer	0,5 µl
oligo dTs	0,5 µl
0,1 M Dithiothreitol (DTT)	2 µl
Superscript II [®] Reverse Transkriptase	1 µl

Der Hälfte des Ansatzes wurde Superscript[®] II Reverse Transkriptase zugesetzt. Die andere Hälfte wurde für die -RT-Kontrolle mit H₂O auf das Endvolumen gebracht.

Neun µl des Master-Mix wurden mit 11 µl der DNase verdauten RNA anschließend für 50 Minuten bei 42°C im Mastercycler inkubiert.

In dieser Zeit fand die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase statt. Anschließend wurde das Enzym durch die Erhitzung der Ansätze auf 72°C für 15 Minuten inaktiviert und die Proben wieder auf 4°C abgekühlt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.4.2 Vorbereitung der *single-cell* RT-PCR

Die *single-cell*-RT-PCR dient der Genexpressionsanalyse einer einzelnen, spezifischen Zelle. In dieser Studie wurden im Speziellen bronchopulmonale vagale C-Faser-Neurone isoliert und untersucht.

Der erste notwendige Schritt bestand dabei in der bereits beschriebenen intratrachealen Markierung der sensiblen, atemwegsinnervierenden, vagalen Neurone anhand des Farbstoffs DiI. Im Anschluss wurden die Neurone mittels Zelldissoziation aus dem Gewebeverband gelöst und unter dem Mikroskop einzeln isoliert. Anschließend konnten sie in der *single-cell* RT-PCR analysiert werden (Abb. 2.2).

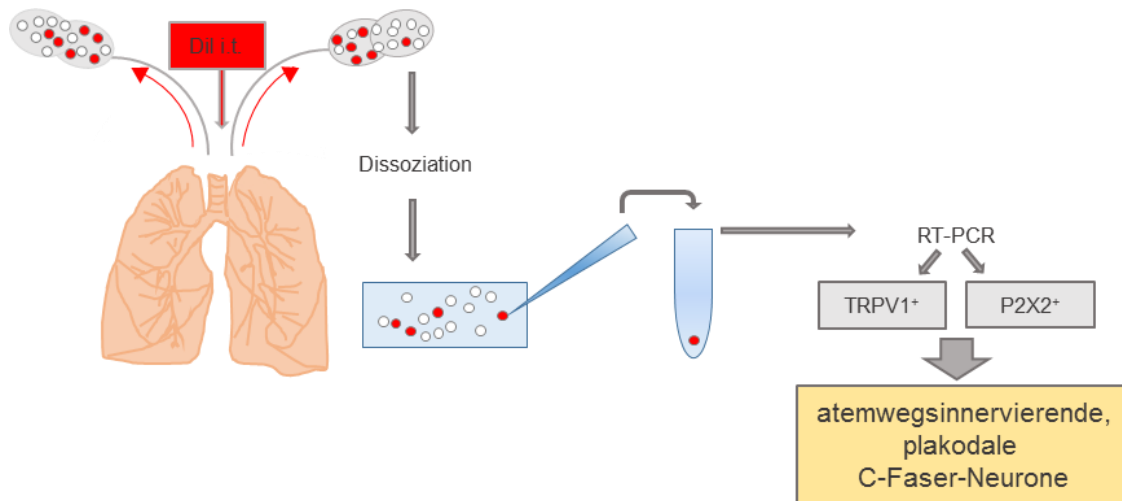


Abb. 2.2: Isolierung und Charakterisierung atemwegsinnervierender, plakodaler C-Faser-Neurone aus dem JNG der Maus

Der Farbstoff Dil wurde intratracheal (i.t.) appliziert sodass sich nach Gewebedissoziation alle atemwegsinnervierenden Neurone des JNG fluoreszierend darstellen und über eine Glaskapillare vom Objektträger geerntet werden konnten. In der RT-PCR wurden die plakodalen C-Faser-Neurone anhand ihrer TRPV1- und P2X2-Expression identifiziert.

2.4.2.1 Zell-Dissoziation

Material:

- Kollagenase (von Clostridium histolyticum, Typ I), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Dispase (neutrale Protease vom Bacillus polymya, Grad II), Roche Applied Science, Rotkreuz, CHF
- HBSS, Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Wasserbad FrigoMix mit Thermomix, B. Braun, Melsungen, D
- Leibovitz's L-15 Medium, Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Pasteurpipetten, Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe D
- Zentrifuge Heraeus Sepatech, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Poly-L-Lysine, Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Laminin, Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Cellstar® 12 Well Cell Culture Plate, Greiner Bio-One, Kremsmünster, AU
- Deckgläschen rund, R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Wärmeschrank, MEMMERT GmbH + Co. KG, Schwabach, D

Lösungen und Puffer:

Enzym-Puffer

Kollagenase	2 mg
Dispase	2 mg
HBSS	1 ml

Um die präparierten, vagalen Ganglien aus dem Zellverband zu lösen, wurden 3 Glaspipetten mit abnehmenden Spitzendurchmesser vorbereitet und nach folgendem Schema verfahren:

- dreißigminütige Inkubation mit Enzym-Puffer bei 37°C im Wasserbad
- mechanische Auftrennung mit Glaspipette vom größten Spitzendurchmesser
- fünfzehnminütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad
- mechanische Auftrennung mit Glaspipette vom mittleren Spitzendurchmesser
- fünfzehnminütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad
- mechanische Auftrennung mit Glaspipette vom kleinsten Spitzendurchmesser

Im Anschluss wurde die Zelllösung jeweils dreimal mit L-15 Medium gewaschen, indem die Probe für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand jeweils abpipettiert wurde. Das Sediment wurde mit L-15 Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und jeweils ca. 25 µl der Zellsuspension auf Poly-L-Lysin/Laminin beschichtete, runde Deckgläschen in 12 Well-Platten aufgetragen. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank hatten sich die Neurone an den Objektträger angeheftet, während andere Gewebereste durch Zugabe von 2 ml L-15 Medium weggespült werden konnten.

2.4.2.2 Cell Picking

Material:

- Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt, D
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, D
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Merck, Darmstadt, D
- Magnesiumchlorid (MgCl_2), Merck, Darmstadt, D
- Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Merck, Darmstadt, D
- D (+)-Glucose, life technologies (Gibco), Carlsbad, CA, USA
- Mikropipette Puller, Sutter Instrument, Novato, CA, USA
- Glaspipetten GB150TF-10, Science Products GmbH, Hofheim, D
- Zeiss Axioskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Peristaltikpumpe minipuls 2, Gilson[®], Middleton, WI, USA
- RNaseOut[™] (40 U/µl), life technologies[™] (Invitrogen[™]), Carlsbad, CA, USA
- PCR Tube Strips 0,2 ml, Eppendorf AG, Hamburg, D

Lösungen und Puffer:

Locke-Puffer für 1 l Aqua bidest

NaCl	7,948 g	136 mM
KCl	0,417 g	5,6 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,166 g	1,2 mM
NaHCO_3	1,201 g	14,3mM
MgCl_2	0,114 g	1,2mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0,323 g	2,2mM
D (+)-Glucose	1,802 g	10 mM

Das *Cell Picking* ermöglicht es, unter dem Mikroskop eine einzelne Zelle auszusuchen, aufzunehmen und anschließend eine Einzelzellanalyse durchzuführen.

Die Objektträger mit der inkubierten Zellsuspension konnten in den folgenden 8 Stunden nach Zell-Dissoziation unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden. Die Objektträger wurden auf dem Objektisch eingespannt und kontinuierlich mit Locke-Puffer perfundiert. Unter fluoreszierendem Licht stellten sich die über axonalen Transport retrograd gefärbten Zellen leuchtend rot dar, sodass diese als Afferenzen bronchopulmonalen Ursprungs identifiziert und mittels einer Glaspipette durch Sog isoliert werden konnten. Die Glaspipetten wurden zuvor mit einem Mikropipettenpuller auf einen gewünschten Durchmesser gezogen und mittels eines Mikromanipulators gesteuert. Aufgrund des kleinen Spitzendurchmessers der Glaspipette wurde verhindert, dass mehrere Zellen gleichzeitig in die Pipette aufgenommen wurden. Anschließend wurde die Pipettenspitze in einem PCR-Reaktionsgefäß zerbrochen. In diesem befand sich 1 µl RNase Inhibitor. Die Proben wurden unmittelbar bei -20°C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung im Gefrierschrank gelagert.

2.4.2.3 DNase-Verdau und reverse Transkription auf *single-cell* Ebene

Material:

- SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis Kit, life technologies (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Random Primers, Life Technologies™ (Applied Biosystems®), Carlsbad, CA, USA
- Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg, D

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte anhand des Protokolls für den „SuperScript III CellsDirect cDNA Synthesis Kit“. Dieses eignet sich speziell zur cDNA-Synthese von Proben, bei denen zuvor keine RNA-Isolation stattgefunden hat.

Es wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Die eingefrorenen Proben wurden aufgetaut, mit 10 µl eines Resuspensionspuffers versetzt und für 10 Minuten bei 75°C im Thermocycler inkubiert. Im Anschluss wurden den Proben für den fünfminütigen DNase-Verdau bei Raumtemperatur folgende Substanzen zugefügt:

DNase I (1 U/ µl)	5 µl
10 × DNase I Buffer	1,6 µl

Der Vorgang wurde mit 1,2 µl EDTA (25 mM) pro Ansatz und fünfminütiger Inkubation bei 70°C gestoppt und die Proben anschließend auf Eis gelagert.

Für die cDNA-Synthese wurde folgender Ansatz pro Reaktionsgefäß vorbereitet:

Oligo(dT)20 (50 mM)	1 µl
Random Hexamers	1 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl

Die Proben wurden für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gelagert. Für die -RT-Kontrolle wurden jeweils 3,5 µl der Probe in ein separates Reaktionsgefäß überführt.

Im nächsten Schritt wurde ein Mastermix aus folgenden Komponenten angesetzt.

5 × RT Puffer	6 µl
RNase Out™ (40 U/µl)	1 µl
0,1 M DTT	1 µl

1/6 des Ansatzes (1,33 µl pro Probe) wurde für die -RT-Kontrolle in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,17 µl H₂O pro Probe auf ein Gesamtvolumen von 1,5 µl aufgefüllt. 5/6 des Ansatzes wurde mit 0,83 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) auf ein Gesamtvolumen von 7,5 µl gebracht. Der fertige Mastermix wurde den Proben (25 µl Endvolumen) und ihrer -RT-Kontrolle (5 µl Endvolumen) zugefügt und dieser zur cDNA-Synthese im 50°C vorgeheizten Thermocycler für 50 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde für 5 Minuten bei 85°C inaktiviert und die fertige cDNA bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.4.3 Qualitative RT-PCR

Material:

- HotStarTaq Polymerase, Qiagen GmbH, Hilden, D
- dNTP Set, Qiagen GmbH, Hilden, D
- MgCl₂, Qiagen GmbH, Hilden, D
- 10 × buffer, Qiagen GmbH, Hilden, D
- Primer (s. 9.1), Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, D

Die PCR wurde mit dem „HotStarTaq Polymerase Kit“ von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für jedes untersuchte *Target* wurden mit Hilfe des Programms „Primer-Blast“ intronspannende, spezifische Primer kreiert. Daraus wurde ein zu gleichen Teilen aus Forward (fwd.)- und Reverse (rev.)-Primer bestehendes Primergemisch angesetzt. Die 100 µM Stammlösungen der beiden Komponenten wurden im Primergemisch jeweils in

einem Verhältnis von 1:20 mit H₂O vorverdünnt. Zwei µl des intronspannenden Primergemisches wurden in die Reaktionsgefäße vorgelegt (im 20 µl Reaktionsansatz Endkonzentration von 250 nM). Im nächsten Schritt wurde ein Master-Mix angesetzt. Aufgrund der Inaktivität der „HotStarTaq-Polymerase“ ohne die initiale Hitzeaktivierung konnte dessen Vorbereitung bei Raumtemperatur erfolgen.

Er setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

	pro Probe
10 × buffer	2 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	0,8 µl
dNTPs	0,4 µl
HotStarTaq-Polymerase	0,125 µl
H ₂ O	13,5 µl

Pro Reaktionsgefäß wurden 17 µl Master-Mix eingesetzt. *Template* für die PCR war die zuvor synthetisierte cDNA. Es wurde jeweils 1,2 µl pro Ansatz verwendet, sodass ein Endvolumen von 20 µl vorlag. Um DNA-Kontamination des eingesetzten Primermixes auszuschließen, wurde pro Primer eine PCR-Reaktion mit RNase freiem Wasser statt cDNA durchgeführt. Außerdem wurden stichprobenartig -RT-Kontrollen gefahren. Als Positivkontrolle für den Erfolg der RNA-Isolation und cDNA-Synthese wurden Reaktionen mit einem Primerpaar für das ubiquitär vorkommende Strukturprotein β-Aktin verwendet. Die PCR wurde mit folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt: Der erste Schritt bestand in der Hitzeinkubation der „HotStarTaq Polymerase“ bei 95°C für 15 Minuten, um das Enzym zu aktivieren. Im Anschluss fand die Amplifizierung der cDNA statt. Dafür erfolgte eine dreißigsekündige Erwärmung der Proben auf 95°C, die der Denaturierung der beiden DNA Stränge diente. So konnten die Primer bei der Annealing-Temperatur von 60°C für 30 Sekunden an den DNA-Strang binden. Auf die Primerhybridisierung folgte die Elongation der Stränge durch die „HotStarTaq Polymerase“ bei ihrem Temperaturoptimum von 72°C. Je nach Target wurde dieser Zyklus 45-50 × wiederholt. Am Ende des Programms wurde die Temperatur für 10 Minuten auf 72°C gehalten, um die noch nicht abgeschlossene Elongation von DNA-Fragmenten zu vervollständigen. Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Bei bestimmten Primern wurde zu deren Optimierung die MgCl₂-Konzentration oder die Annealing Temperatur variiert. Einen Überblick darüber bietet die Tab. 9.1. im Anhang.

2.4.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Material:

- Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
- TRIS, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
- Eisessig, Merck, Darmstadt, D
- 0,5 M EDTA pH 8,0, Life Technologies™ (Ambion®), Carlsbad, CA, USA
- Ethidiumbromid 1%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Gelelektrophoresezubehör, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
- Power Supply PS500XTDC, Hoefer, Holliston, MA, USA
- Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific (Fermentas Life Sciences), Waltham, MA, USA
- Orange-G, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Glycerol, Merck, Darmstadt, D
- Foculus IEEE1394 digital camera, New Electronic Technology Vertriebsgesellschaft mbH, Finning, D
- UV-Transilluminator, Biometra, Göttingen, D
- Auswertungssoftware, Firewire Camera Control Center, USA

Lösungen und Puffer:

50 × TAE-Puffer

TRIS	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
Aqua bidest	ad 1 l

Ladepuffer

Orange-G	Spatelspitze
Glycerol	25 ml
1 × TAE	25 ml

Die Auftrennung der Nukleinsäure-Stränge erfolgte entsprechend ihrer Größe in einer Gelmatrix im elektrischen Feld.

Ein 2%iges Agarosegel, bestehend aus 2 g Agarose und 100 ml 1 × TAE Puffer, wurde im Erlenmeyer-Kolben in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelkammer gegossen und zum Visualisieren der PCR-Produkte 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben und gut vermischt. Zur Bildung der Taschen wurde ein Kamm als Platzhalter eingesetzt und die Gelmatrix bis zur vollständigen Polymerisierung bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten getrocknet. In der Zwischenzeit wurden die Proben mit je 5 µl Probenauftragspuffer versetzt. Nach Aushärten des Gels wurden die Kämmen vorsichtig entfernt, der Laufpuffer (1 × TAE) in die Kammer gefüllt und die Proben in die vorbereiteten Taschen pipettiert. Die erste und

die letzte Tasche wurden mit dem 100 bp DNA-Marker versehen. Die Proben wanderten bei 140 Volt für ca. eine halbe Stunde im elektrischen Feld und wurden anschließend unter der UV-Lampe bewertet. Die Größe der Banden konnte durch den Vergleich mit dem standardisierten DNA-Marker bestimmt werden.

2.4.5 Quantitative RT-PCR

Material:

- I-Cycler MyiQ2, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
- iQ™ SYBR® Green Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
- PCR-Reaktionsgefäße 0,6 ml, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
- PCR 8er-CapStrips, Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, D
- Primer (s. 9.1), Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- IBM SPSS Statistics, International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, NY, USA

Für die quantitative RT-PCR wurde der „iQ™ SYBR® Green Supermix“ von Bio-Rad verwendet. Dieser enthält den für die Fluoreszenzmessung benötigten interkalierenden Farbstoff SYBR® Green sowie alle weiteren für eine qRT-PCR notwendigen Substanzen. Die Zusammensetzung eines einfachen 20 µl Ansatzes stellte sich wie folgt dar:

Template cDNA	1 µl
Mastermix SYBR® Green	10 µl
Primer (rev. + fwd.)	0,5 µl
H ₂ O	8,5 µl

Die Versuchsreihe wurde nach folgendem Protokoll im Thermocycler durchgeführt: Zunächst wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, um die bei Raumtemperatur inaktive HotStarTaq DNA Polymerase zu aktivieren. Im Anschluss fand in 45 Zyklen die Vervielfältigung der untersuchten DNA-Sequenz statt. Dafür erfolgte zunächst eine dreißigsekündige Erwärmung der Proben auf 95°C, um die Wasserstoffbrückenbindung der beiden DNA-Stränge aufzubrechen. Im nächsten Schritt konnten die Primer bei der Annealing-Temperatur von 60°C für 30 Sekunden mit dem DNA-Strang hybridisieren. Es folgte die Elongation der Stränge durch die DNA-Polymerase bei ihrem Arbeitsoptimum von 72°C für 30 Sekunden. Nach abgelaufener PCR schloss sich durch stetige Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C (0,5°C pro 10 Sekunden in 61 Zyklen) unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Schmelzkurvenanalyse an. Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen, erfolgte stets eine Dreifachbestimmung jeder Probe. Für die Quantifizierung wurde außerdem ein

Houskeeping Gene jeder Probe mitgemessen, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA zu relativieren und somit eine Quantifizierung vornehmen zu können. Die Auswertung der qRT-PCR erfolgt anhand der Beurteilung des *Cycle Threshold* (Ct-Wertes). Die relative Expression wurde nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel berechnet.

Um die Spezifität des Amplifikats zu überprüfen, wurde das Amplifikat zum einen im 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt (2.4.4) sowie eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.4.6 Restriktionsenzymverdau

Material:

- AccI (R0161S) und 10 × NEB4 Puffer, New England Biolabs® Inc. Ipswich, MA, USA

Für den Restriktionsenzymverdau wurde folgender Ansatz vorbereitet:

PCR-Produkt	8 µl
10 × NEB4 Puffer	0,9 µl
Restriktionsenzym	0,2 µl

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Restriktionsenzym AccI spaltet die DNA-Sequenz -GTAGAC-. Es wurde ein Ansatz aus den in der Tabelle gelisteten Komponenten hergestellt und dieser für eine Stunde bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch eine zwanzigminütige Erwärmung auf 80°C inaktiviert. Das Produkt wurde im 2%igen Agarosegel aufgetrennt (2.4.4) und unter der UV-Lampe ausgewertet.

2.4.7 Sequenzierung

Für die Sequenzierung einer spezifischen PCR-Bande wurde diese aus dem Agarosegel extrahiert, aufgereinigt und nachfolgend die Nukleotidabfolge des DNA-Moleküls bestimmt.

2.4.7.1 Agarosegel-Extraktion

Material:

- UV-Transilluminator TI 1, Biometra GmbH, Göttingen, D
- X-TRACTA Generation II; Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
- QIAEX II Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden, D
- Thermomixer MHR 23, HLC BioTech, Bovenden, D
- Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, D

Die PCR wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die Produkte im 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Agarosegel-Extraktion erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ wie folgt:

Die gewünschte PCR-Bande wurde auf einem UV-Tisch ausgestochen und ein abgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht der DNA-Bande wurde ermittelt und das Dreifache des QX1-Puffers (Komponente des „QIAEX II Gel Extraction Kit“) hinzugefügt. Als Nächstes wurde die DNA-bindende QIAEX II Suspension (Komponente des „QIAEX II Gel Extraction Kit“) für 30 Sekunden auf dem Vortexmischer resuspendiert und 15 µl zu den Proben pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 Minuten bei 50°C im Thermoblock inkubiert. QIAEX II wurde dabei durch konstantes Mischen auf dem Thermomixer in Suspension gehalten. Während dieses Arbeitsschrittes löste sich die Agarose auf und die DNA wurde gebunden. Anschließend folgte eine einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl QX1-Puffer durch Mischen und anschließende Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 rpm) gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, sodass alle übrigen Agarosespuren beseitigt wurden. Um restliche Salzkontaminationen zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 500 µl PE-Puffer (Komponente des „QIAEX II Gel Extraction Kit“) durch Mischen und anschließende Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 rpm) gewaschen. Das Pellet wurde für 15 Minuten an der Luft getrocknet. Zum Eluieren der DNA wurde 20 µl H₂O hinzugegeben und das Pellet auf dem Vortex resuspendiert. Die Probe wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 Minute zentrifugiert. Der die gereinigte DNA enthaltene Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt.

2.4.7.2 Externe Sequenzierung

Material

- Qiagen Sequencing Services, Qiagen GmbH, Hilden, D

Die aufgereinigte DNA wurden dem Qiagen Sequenzierungsservice in Hilden mit dem zugehörigen Primerpaar zugesendet und in unserem Auftrag als *single read* (800160) sequenziert.

2.5 Western Blot

2.5.1 Herstellung eines Proteinextraktes

Material:

- Harnstoff, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Glycerol, Merck, Darmstadt, D
- SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- 1, 4 Dithiothreitol (DTT), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- TRIS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Proteinase Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free, Calbiochem® (Merck Millipore), Billerica, MA, USA
- Kugelmühle und Metallkugeln, Retsch GmbH, Haan, D
- Zentrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, D

Puffer und Lösungen:

Harnstoffextraktionspuffer

Harnstoff (8 M)	1 ml
Glycerol	100 µl
20% SDS	50 µl
DTT (1 M)	5 µl
TRIS/HCL (1 M) pH 6,8	10 µl
PMSF (100 mM)	5 µl
Protease Inhibitor Cocktail Set III	5 µl

Zunächst erfolgte die Organentnahme. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Mauslunge und, als Kontrollgewebe, Mausgehirn eingesetzt. Die Gewebe wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und gewogen. Den Geweben wurde dann die zehnfache Menge eines Harnstoffextraktionspuffers zugefügt. Die Probe wurde für 10 Minuten in der Kugelmühle bei 30 Hz homogenisiert. Darauf folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 5.000 rpm.

2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Material:

- Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Bovine Serum Albumin Standard, Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, IL, USA
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Bio Photometer, Eppendorf AG, Hamburg, D

Um eine definierte Menge eines Proteingemisches auf das Gel auftragen zu können, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Diese ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung einer Proteinkonzentration (1-10 µg/ml

Proteingehalt) in einer unbekanntem Probe und beruht auf einer Verschiebung des Absorptionmaximums von 470 nm (ungebundene Form) auf 595 nm nach Proteinbindung im sauren Medium. Zunächst wurden die Proben 1:50 verdünnt (2 µl der Probe in 98 µl 0,9%iger Kochsalzlösung). Für die Verdünnungsreihe wurden pro Probe 3 Eppendorf-Reaktionsgefäße bereitgestellt, in die jeweils 10 µl, 20 µl, und 50 µl der entsprechenden Ausgangslösung pipettiert und anschließend mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt wurde. Zur Proteinkonzentrationsbestimmung in einer Probe ist beim Bradford-Test eine vorherige Kalibrierung mit einem Standardprotein notwendig. Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt. Ein BSA-Standard wurde mit 0,9%iger Kochsalzlösung 1:10 verdünnt (50 µl Albumin + 450 µl 0,9%iger Kochsalzlösung). Dann wurden 6 Eppendorf-Reaktionsgefäße bereitgestellt und die entsprechenden in der Tabelle aufgeführten Mengen 0,9%iger Kochsalzlösung vorgelegt. Anschließend wurde die Albuminverdünnung zugefügt. Für Verdünnung 1, 2 und 3 wurde die angesetzte Ursprungslösung verwendet. Für Verdünnung 4 wurde die Verdünnung 3, für Verdünnung 5 und 6 wurde die Verdünnung 4 als Ausgangslösung verwendet.

Verdünnung	Endkonzentration	Ausgangskonzentration	Volumen der Ausgangslösung	Zugabe von 0,9% NaCl
1	25 µg/ml	200 µg/ml	150 µl	1,05 ml
2	15 µg/ml	200 µg/ml	90 µl	1,11 ml
3	10 µg/ml	200 µg/ml	150 µl	2,85 ml
4	5 µg/ml	10 µg/ml	1,0 ml	1,0 ml
5	2,5 µg/ml	5 µg/ml	600 µl	600 µl
6	1 µg/ml	5 µg / ml	240 µl	960 µl

Für die Doppelbestimmung des Standards wurden zweimal 6 Eppendorf-Reaktionsgefäße gerichtet und beschriftet. Zu 500 µl der jeweiligen Albuminverdünnungen wurden 500 µl der Bradfordreagenz zugegeben. Ebenso wurden die verdünnten Proben mit Bradfordreagenz versetzt. Für den Leerwert wurden 500 µl H₂O mit 500 µl Bradfordreagenz eingesetzt. Nach Zugabe des Reagenz war das Farbstoff-Protein Gemisch für ca. eine Stunde stabil. Die Extinktion wurde in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Zunächst wurde der Standard anhand der Albuminverdünnungsreihe erstellt. Anschließend konnte der Proteingehalt der einzelnen Proben gemessen werden.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material:

- Rotiphorese Gel 30, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- TRIS, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- 1N Salzsäure, Merck, Darmstadt, D
- Tetramethylethylenediamin (TEMED), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Ammoniumpersulfat (APS), Merck, Darmstadt, D
- Glycin, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D
- Dual Gel Caster SE245, Hoefer, Holliston, MA, USA
- Elektrophorese System SE250, Hoefer, Holliston, MA, USA
- Power Supply PS500XTDC, Hoefer, Holliston, MA, USA
- Kühlsystem Rm6B Lauda, Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen, D
- Page Ruler prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific (Pierce Biotechnology), Rockford, IL, USA
- Bromphenolblau-Na-Salz, SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
- Glycerol, Merck, Darmstadt, D
- HeLa Whole Cell Lysat (sc-220), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
- MOLT-4 Cell Lysat (sc-2233), Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
- recombinant mouse FGF acidic, R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA
- recombinant human FGF18 (100-28), PeproTech®, Rocky Hill, NJ, USA
- FGF2 peptide (ab134425), abcam®, Cambridge, UK
- FGF2 protein (active) (ab129033), abcam®, Cambridge, UK

Lösungen und Puffer:

2 M TRIS/HCl pH 8,8

TRIS	24,2 g in 50 ml Aqua bidest lösen
1N HCL	auf pH 8,8 einstellen
Aqua bidest	auf 100 ml auffüllen

1 M TRIS/HCl pH 6,8

TRIS	12,1 g in 50 ml Aqua bidest lösen
1N HCL	auf pH 6,8 einstellen
Aqua bidest	auf 100 ml auffüllen

Trenngel 15 % (30 ml/4 Gele)

30% Acrylamid/0,8 Bisacrylamid	15,0 ml
2 M TRIS/HCL pH 8,8	5,6 ml
20% SDS	150 µl
Aqua dest.	9,25 ml
TEMED	15 µl
10% Ammoniumpersulfat	160 µl

Sammelgel (10 ml/4 Gele)

30% Acrylamid/0,8 Bisacrylamid	1,0 ml
2 M TRIS/HCL pH 6,8	50 µl
20% SDS	1,25 ml
Aqua bidest	7,7 ml
TEMED	15 µl
10% Ammoniumpersulfat	120 µl

5 × Probenauftragspuffer pH 6,8

TRIS	1,96 g
SDS	2,5 g
Bromphenolblau	12,5 mg
Aqua dest.	ad 20 ml (auf pH 6,8 einstellen)
Glycerol	25 ml
Aqua bidest	ad 500 ml
DTT	eine Prise unmittelbar vor Gebrauch

10 × Elektrophoresepuffer (für 1 l)

0,25 M TRIS	30, 275 g
1,92 M Glycin	144 g
Aqua bidest	ad 1 l

Laufpuffer (700 ml/4 Gele)

10 × Elektrophoresepuffer	70 ml
20% SDS	1,75 ml
Aqua bidest	700 ml

Für die *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ein 15%iges Acrylamidgel gegossen. Zunächst wurde die Gelkammer zusammgebaut, das Trenngel angesetzt und in die Kammer überführt. Um es vor dem Austrocknen zu schützen, wurde das Gel mit 0,5%igem SDS beschichtet, mit feuchten Tüchern bedeckt und anschließend über Nacht im Kühlschrank zum Polymerisieren aufbewahrt. Am Folgetag wurde das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel pipettiert, die Kämme (mit jeweils 10 Taschen) eingesetzt und das Gel erneut für ca. eine Stunde unter feuchten Tüchern zum Polymerisieren aufbewahrt. Anschließend konnten die Kämme vorsichtig herausgezogen, die Taschen mit Aqua bidest gespült und die Gelmatrix in die Elektrophoreseeinheit eingespannt werden. Dann wurde der Laufpuffer eingefüllt.

Zur Vorbereitung der Proben wurde ein 5 x Probenauftragspuffer mit einer Prise Dithiothreitol (DTT) versetzt und mit H₂O 1:1 verdünnt. Pro Tasche wurden 20 µg Proteingemisch aufgetragen. Das benötigte Volumen jeder Probe wurde entsprechend seines Proteingehaltes errechnet und mit PBS auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Neben den Gewebeproben wurden entsprechend den Angaben des Antikörperherstellers Positivkontrollen eingesetzt. Für den Anti-FGFR1-Antikörper wurde ein humanes Zelllysate aus akuten lymphatischen Leukämiezellen (MOLT-4 Cell Lysate) und ein

humanes Zelllysat aus epithelioiden Karzinomzellen (HeLa Whole Cell Lysat) eingesetzt. Für den Anti-FGF1-, Anti-FGF2-, und Anti-FGF18-Antikörper wurde jeweils das rekombinante Protein als Positivkontrolle verwendet. Zu jeder Probe wurden 10 µl 2,5 × Probenauftragspuffer pipettiert. Anschließend wurden die Proben gemischt, für 5 Minuten bei 95°C im Blockthermostat erhitzt und bei 8.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Mit Hilfe einer Schablone wurden 5 µl eines Markers bzw. 20 µl der Proben in die Taschen pipettiert. Im Sammelgel wurde für 30 Minuten eine Spannung von ca. 100 Volt angelegt, bis die Probenfront die Trennlinie erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte für ca. 1 Stunde bei ca. 200 Volt.

2.5.4 Semi-Dry-Blot

Material:

- PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter SEDEC, Peqlab, Erlangen, D
- Rotilabo-Blottingpapiere, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Immobilon-P Transfer Membran, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Methanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- 6-Aminohexansäure, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- 1N Salzsäure, Merck, Darmstadt, D
- Ponceau S solution 0,1% (w/v) in 5% acetic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Milchpulver, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Tween® 20, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Schüttelplatte Swip Akku, Edmund Bühler, Hechingen, D

Lösungen und Puffer:

Konzentrierter Anodenpuffer (+) Puffer I

300 mM TRIS pH 10,4	9,09 g
20% Methanol	50 ml
Aqua bidest	ad 250 ml

Einfacher Anodenpuffer (+) Puffer II

30 mM TRIS pH 10,4	0,91 g
20% Methanol	50 ml
Aqua bidest	ad 250 ml

Kathodenpuffer (-) Puffer III

40 mM 6-Aminohexansäure	1,3117 g
25 mM TRIS pH 9,4	0,76 g
20% Methanol	50 ml
Aqua bidest	ad 250 ml

10 × TBS

TRIS	12,11 g
NaCl in Aqua bidest.	87,66 g in 800 ml
mit HCL	auf pH 8,0 einstellen
mit Aqua bidest	auf 1 l auffüllen

1 × TTBS

10 × TBS	100 ml
Tween® 20	0,5 ml
Aqua bidest	899,5 ml

Blockpuffer 10%

TTBS	90 ml
Milchpulver	10 g

Zur Vorbereitung des *Semi-Dry*-Blots wurden 3 verschiedene Transferpuffer angesetzt. Neun Filterpapiere pro Gel und die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurden auf die Größe der Gelmatrix zugeschnitten (8,5 cm × 5,5 cm) und die PVDF-Membran beschriftet. Die einzelnen Bestandteile wurden zuvor in den Puffern getränkt. Die PVDF-Membran wurde für 15 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für 2 Minuten in Aqua bidest geschwenkt. Der Aufbau des Transfers erfolgte von unten nach oben entsprechend dem folgenden Schema:

3 Lagen Filterpapier	Puffer I
3 Lagen Filterpapier	Puffer II
PVDF-Membran	Puffer II
SDS-Gel	Puffer III
3 Lagen Filterpapier	Puffer II

Die Elektroden wurden an das Netzgerät angeschlossen und pro Gel für 90 Minuten eine Stromstärke von 90 mA angelegt. Um den Erfolg des Proteintransfers zu bestätigen, wurde die Membran nach dem Abklatsch in 0,1%iger Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend zum Auswaschen in Aqua bidest geschwenkt. Es folgt eine ca. einstündige Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur in Milchpulverblockpuffer 10%.

2.5.5 Immundetektion

Material:

- Natriumazid, Merck, Darmstadt, D
- Anti-FGF1 antibody (sc-121), rabbit polyclonal to FGFR1, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
- Anti-FGF1 antibody (ab76662), rabbit polyclonal to FGF1, abcam®, Cambridge, UK
- Anti-FGF18 antibody (HPA018795), rabbit polyclonal to FGF18, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Anti-FGF2 antibody (ab106245), Rabbit polyclonal to FGF2 (0,5mg/ml), abcam®, Cambridge, UK
- Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody (31460), HRP conjugate (0,8 mg/ml), Thermo Fisher

Scientific (Pierce Antibodies), Waltham, MA, USA

- Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate/Super Signal West Dura (sensitiver) Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Hypercassette, Amersham Biosciences (Part of GE Healthcare), Chalfont St. Giles in Buckinghamshire, UK
- Röntgenfilm, Amersham Biosciences (Part of GE Healthcare), Chalfont St. Giles in Buckinghamshire, UK
- Röntgenfilmentwickler und Röntgenfilmfixierer, AGFA, Mortsel, B

Für die Immundetektion wurde ein 5%iger Milchpulverblockpuffer mit 10%igem Natriumazid in einem Verhältnis von 1:1000 versetzt und der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung zugegeben. Ca. 3 ml desselbigen wurden anschließend vorsichtig auf die PVDF-Membran pipettiert und über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran viermal im Abstand von jeweils 10 Minuten mit TTBS gewaschen. Anschließend erfolgte die ein- bis zweistündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:10000 in 2,5%igem Milchpulverblockpuffer angesetzt und vorsichtig auf die Membran pipettiert. Darauf schloss sich erneut ein Waschvorgang mit TTBS (sechsmal im Abstand von 5-10 Minuten) an. Als nächstes wurde die Chemolumineszenzreaktion vorbereitet. Die 2 Komponenten der *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung wurden in dem Verhältnis 1:1 in einem lichtundurchlässigen Gefäß gemischt und anschließend gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation im Dunkeln. Danach wurde die Membran in der Expositionstasche der Kassette zwischen 2 Folien mittig aufgebracht. In der Dunkelkammer erfolgte dann die Exposition mit einem zugeschnittenen Röntgenfilm mit anschließender Entwicklung und Fixierung. Die Expositionszeiten wurden nach Bedarf variiert. Die Filme wurden getrocknet, beschriftet und der Marker auf den Film übertragen. Die Membran wurde erneut mit Ponceau S-Lösung gefärbt und auf Filterpapier getrocknet. Die Abbildungen wurden anschließend eingescannt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Software Programm ImageJ welches der Bildverarbeitung und -analyse dient. Dieses Programm nimmt eine Densitometrie vor, indem es die Pixeldichte pro Flächeneinheit der immundetektierten Proteinbanden bestimmt. Aus diesem Dichtewert kann wiederum ein Rückschluss auf die Menge des gesuchten Proteins in einer Probe gezogen werden indem man sie in Relation zu der Pixeldichte einer bekannten Proteinmenge setzt.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Herstellung von Kryostatschnitten

Material:

- TissueTek® O.C.T™ Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL
- 2-Methylbutan, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- CM 1900 Kryostat, Leica, Wetzlar, D
- SuperFrost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen, D
- Aceton, Merck, Darmstadt, D
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{P}_0_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HP}_0_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Natriumchlorid (NaCl), Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, USA
- Horse Serum, PAA Laboratoriers GmbH, Pasching, AUT

Lösungen und Puffer:

Phosphatpuffer (PP) pH 7,4

für 1 l

Lösung A	31, 2 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat /1 l Aqua bidest	230 ml
Lösung B	35, 6 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat/1 l Aqua bidest	770 ml

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4

Lösung A	28,75 ml
Lösung B	96,20 ml
NaCl	22,4 g
Aqua bidest	ad 5 l

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Kryostatschnitte der Lunge angefertigt. Zunächst wurde der rechte Lungenflügel abgeklemmt. Der linke Lungenflügel wurde anschließend über eine Venenverweilkanüle mit 0,5 ml TissueTek® O.C.T™ (1:3 verdünnt mit PBS) gebläht, abgebunden, in TissueTek® O.C.T. (unverdünnt) eingebettet und in 2-Methylbutan, welches zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, schockgefroren. Die eingebetteten Lungenflügel wurden bei -80°C aufbewahrt. Das Gewebe wurde direkt vor dem Schneiden mit TissueTek® O.C.T. auf einen Halter aufgebracht und am Kryostat bei ca. -20°C in 10 μm dicke Schnitte geschnitten. Anschließend wurden diese auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden für 10 Minuten bei -20°C mit Aceton fixiert und anschließend für eine Stunde mit 50%igem Pferde-Serum geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Material:

- Anti-FGF2 antibody (ab106245), Rabbit polyclonal to FGF2, abcam[®], Cambridge, UK
- FGF2 protein (active) (ab129033), abcam[®], Cambridge, UK
- Donkey Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (AP128C), Cy3 conjugate, Species Absorbed, Chemicon (Merck Millipore), Billerica, MA, USA
- Paraformaldehyd (PFA), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Natriumcarbonat (Na₂CO₃), Merck, Darmstadt, D
- Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), Merck, Darmstadt, D
- Glycerol, Merck, Darmstadt, D
- Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- AxioCam MRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- AxioVision rel 4.8 Software, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

Lösungen und Puffer:

Phosphatgepufferte Salzlösung +S (PBS+S), pH 7,4

Lösung A	28,75 ml
Lösung B	96,20 ml
NaCl	44,8 ml
Aqua bidest	ad 5 l

Gepuffertes Glycerol pH 8,6

für 1 l

Lösung A	159 g Na ₂ CO ₃ /1 l Aqua bidest (1,5 M)	250 ml
Lösung B	126 g NaHCO ₃ /1 l Aqua bidest (1,5 M) Lösung B mit Lösung A auf pH 8,6 einstellen	250 ml
Lösung C	Glycerol, wasserfrei	500 ml

Nach dem Blocken wurde das Pferdeserum vorsichtig abgesaugt. Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1,5 µg/ml mit PBS+S angesetzt und ca. 200 µl der Lösung pro Objektträger aufgetragen. In einer feuchten, luftdicht abgeschlossenen Kammer wurden die Gewebeschnitte über Nacht im Dunkeln mit dem Primärantikörper inkubiert. Bei den Negativkontrollen wurde hingegen ausschließlich die Trägerlösung des Primärantikörpers, reines PBS+S, verwendet. Sie diente der Detektion einer unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers an das Gewebe. Um die Spezifität des Primärantikörpers zu prüfen, wurde im Rahmen des Präabsorptionstests der Primärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der vierfachen Menge des rekombinanten Proteins inkubiert, bevor er auf den Objektträger aufgetragen wurde. Der restliche Ablauf erfolgte äquivalent zu den übrigen Proben. Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Objektträger zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit je 100 µl des in PBS+S 1:2000

verdünnten, fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund dessen Lichtempfindlichkeit fanden auch die folgenden Schritte im Dunkeln statt. Der Sekundärantikörper wurde abgesaugt und es wurde zweimal je 5-10 Minuten mit PBS gewaschen. Um die Immunreaktion zu stabilisieren, erfolgte die zehnmündige Nachfixierung in PFA 4%. Abschließend wurden die Objektträger noch zweimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen, gründlich abgesaugt, mit gepuffertem Glycerol beschichtet und mit einem Deckgläschen versehen. Die fertigen Objektträger wurden bei 4°C lichtgeschützt im Kühlschrank bis zur weiteren Verwertung aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Entsprechende Bilder wurden mit Hilfe des „AxioVision“ Dokumentationsprogramms abgespeichert.

2.7 Auswachsassay

Anhand des Auswachsassays sollte die funktionelle Relevanz der FGFs auf das Wachstum der Fortsätze sensorischer Neurone getestet werden.

Material:

- Material für Zelldissoziation (2.4.2.1)
- 8-well Culture Slides, BD Falcon, Erembodegem, B
- Leibovitz's L-15 Medium, Life Technologies™ (Invitrogen™), Carlsbad, CA, USA
- Fetal Bovine Serum (FBS), Thermo Fisher Scientific (HyClone™), Rockford, IL, USA
- Penicillin-Streptomycin, Life Technologies™ (Gibco®), Carlsbad, CA, USA
- recombinant mouse FGF acidic (4686-FA), R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA
- FGF2 protein (active) (ab129033), abcam®, Cambridge, UK
- Paraformaldehyd (PFA), Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Bovine Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Normal Goat Serum (NGS), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Anti-protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibody, Rabbit polyclonal to PGP 9.5, BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, D
- Natriumazid, Merck, Darmstadt, D
- Donkey Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, Cy3 conjugate, Dianova GmbH, Hamburg, D
- gepuffertes Glycerol (2.6.2)
- Axioplan 2 Imaging Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- AxioCam MRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
- Imaris Software, Bitplane AG, Zürich, CH

Lösungen und Puffer:

Medium (100 ml)

Fetal Bovine Serum (FBS)	10 ml
Penicillin-Streptomycin	1 ml
L-15-Medium	89 ml

Blocklösung (100 ml)

Bovine Serum Albumin	5 ml
Normal Goat Serum	5 ml
PBS	90 ml

Für den Auswachsassay wurden die isolierten JNG zunächst dissoziiert (s. 2.4.2.1. Zell-Dissoziation). Nach der Zell-Dissoziation wurde das Lysat jeweils dreimal mit L-15 Medium gewaschen, indem die Probe für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand jeweils abpipettiert wurde. Das Sediment wurde mit L-15 Medium auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und jeweils 200 µl der Zellsuspension pro Kammer auf Poly-L-Lysin/Laminin beschichtete *Culture Slides* aufgetragen. Um das Anheften der Neurone an den Boden der *Culture Slides* zu gewährleisten, erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank. In der Zwischenzeit wurde das Medium für die Neuronenkultur, bestehend aus 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung und L-15-Medium vorbereitet. Um den Effekt der FGFs auf das neuronale Auswachsen zu untersuchen, wurde dem Ansatz jeweils das rekombinante FGF1- bzw. FGF2-Protein zugesetzt. Diese lagen in einer Stammlösung von 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml vor und wurden mit dem Medium 1:1000 bzw. 1:500 auf eine Konzentration von 100 ng/ml verdünnt. Jeweils 200 µl des Mediums wurde pro Kammer hinzugefügt, sodass in den 400 µl Gesamtvolumen eine Endkonzentration der FGF-Proteine von 50 ng/ml vorlag. Für die Negativkontrolle wurde reines Medium verwendet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Neuronenkultur für 24 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C. Am Folgetag wurden 300 µl des Mediums vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden durch vierzigminütige Inkubation mit 600 µl 4%igem PFA (37°C) fixiert. Nachdem das Fixativ abpipettiert wurde, wurden die Neuronenkulturen zweimal mit jeweils 600 µl PBS gewaschen. Zum Permeabilisieren der Zellenmembran wurden 600 µl 0,1%iges Triton X-100 (in PBS) pro Kammer dazugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Die 600 µl wurden abpipettiert und erneut einmal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Proben pro Kammer für 90 Minuten bei Raumtemperatur mit 250 µl Blocklösung inkubiert. Um die Neurone mit ihren Ausläufern fluoreszenzmikroskopisch

darstellen zu können, erfolgte im Anschluss die Immundetektion mit einem Antikörper der gegen den pan-neuronalen Marker *Protein Gene Product 9.5* (PGP 9.5) gerichtet war. Dieser wurde in einem Verhältnis von 1:3000 mit Natriumazid angesetzt und jeweils 125 µl/Kammer über Nacht, bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit den Neuronen inkubiert. Am Folgetag wurden die Kulturen mit 600 µl PBS gespült und im Anschluss zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig entfernt und 150 µl des Cy3-markierten Esel-anti-Kaninchen IgG-Antikörper in einem Verhältnis von 1:2000 in PBS zugesetzt. Nach neunzigminütiger lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Sekundärantikörper mit 600 µl PBS weggespült, die *Culture Slides* im Anschluss zweimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen und zuletzt mit gepufferten Glycerol eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms IMARIS.

2.8 Statistik

Material:

IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, IL, USA

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit der Statistik- und Analyse-Software SPSS 9.0 der SPSS GmbH Software. Die Angaben der Werte erfolgen in der Arbeit als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die graphische Darstellung erfolgt in Form von Boxplots, welche Minimum-, Maximum- und Medianwerte, sowie die Perzentilen 25 und 75 darstellen. Abweichungen vom Mittelwert um mehr als die zweifache Standardabweichung wurden als Ausreißer definiert und einmalig eliminiert. Die Signifikanz der beobachteten Differenzen zwischen der OVA- und PBS-Gruppe wurde mit Hilfe eines nicht-parametrischen Tests für unabhängige Stichproben, dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test), geprüft. Lagen zwei unabhängige Stichproben (OVA/PBS) mit qualitativen Werten in nur zwei Ausprägungen vor (RT-PCR positiv/RT-PCR negativ), wurde dessen Signifikanz mit Hilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertests (χ^2 -Test) geprüft. Irrtumswahrscheinlichkeiten $p \leq 0,05$ wurden als signifikant eingestuft. Werte $p \geq 0,05$ wurden als nicht signifikant eingestuft und in der Arbeit mit n.s. betitelt.

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der allergischen Atemwegsinfektion in der Mauslunge

Die OVA-immunisierte C57BL/6 Maus wurde als Modell für die allergische Atemwegsentzündung im Menschen verwendet. Das Ausmaß der induzierten bronchopulmonalen Inflammation wurde anhand verschiedener Kriterien objektiviert. Zum einen wurde die Quantifizierung und Differenzierung von Entzündungszellen in der BAL vorgenommen. Des Weiteren wurden in histologischen Untersuchungen zelluläre und strukturelle Veränderungen im Lungengewebe im Rahmen der Atemwegsentzündung untersucht.

3.1.1 Auswertung der BAL

3.1.1.1 Absolute Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der GZZ in der BAL erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung der weißen Blutkörperchen (Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile und Eosinophile). Die Versuchsgruppen setzten sich aus jeweils 15 Tieren zusammen. In der PBS-Kontrollgruppe zeigte sich eine physiologisch niedrige GZZ. In der OVA-Gruppe konnte eine signifikante Zunahme der entzündlichen Zellen in der Lavage verzeichnet werden. Im Mittel zeigte sie sich gegenüber der gesunden Kontrollgruppe um mehr als das Sechsfache gesteigert ($183,25 \pm 102,47 \times 10^4$ Zellen/BAL (OVA) vs. $28,83 \pm 18,01 \times 10^4$ Zellen/BAL (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test) (Tab. 3.1, Abb 3.1)

	OVA	PBS
GZZ $\times 10^4$ /BAL	$183,25 \pm 102,47$ *	$28,83 \pm 18,01$

Tab. 3.1: BAL-GZZ von Mäusen nach OVA-Aerosol-Provokation und der PBS-Kontrollgruppe
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der BAL-GZZ. $n = 15$ /Gruppe, $*p \leq 0,05$, U-Test. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf einen Vergleich mit der PBS-Kontrolle.

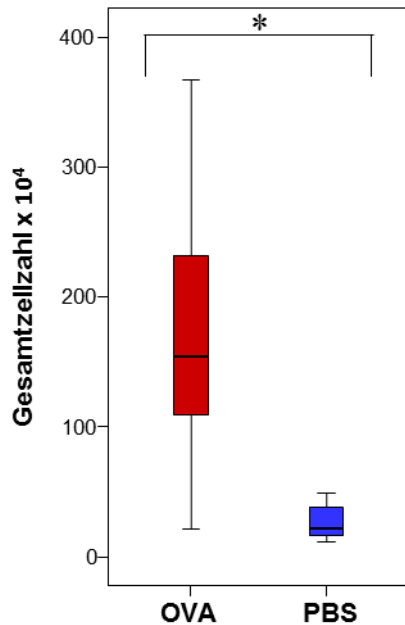


Abb. 3.1: Graphische Darstellung der BAL-GZZ von Mäusen nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation
 24 h nach der letzten OVA- bzw. PBS-Aerosol-Provokation wurde eine BAL durchgeführt. Die GZZ wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahlen sind in ($\times 10^4$) pro BAL angegeben. $n = 15/\text{Gruppe}$, $*p \leq 0,05$, U-Test.

3.1.1.2 Differentialzytologie

Das zelluläre Verteilungsmuster in der BAL einer lungengesunden Maus besteht zu $>85\%$ aus Alveolarmakrophagen, zu $<13\%$ aus Lymphozyten, zu $<3\%$ aus Neutrophilen und zu $<0,5\%$ aus Eosinophilen (Bob und Bob 2001). Mit Hilfe der May-Grünwald-Giemsa-Färbung konnte anhand morphologischer Kriterien zwischen den vier verschiedenen Zellpopulationen unterschieden werden (Abb. 3.2). Es wurden ca. 500 Zellen eines BAL-Ausstriches differenziert und der prozentuale Anteil der Zelltypen bestimmt.

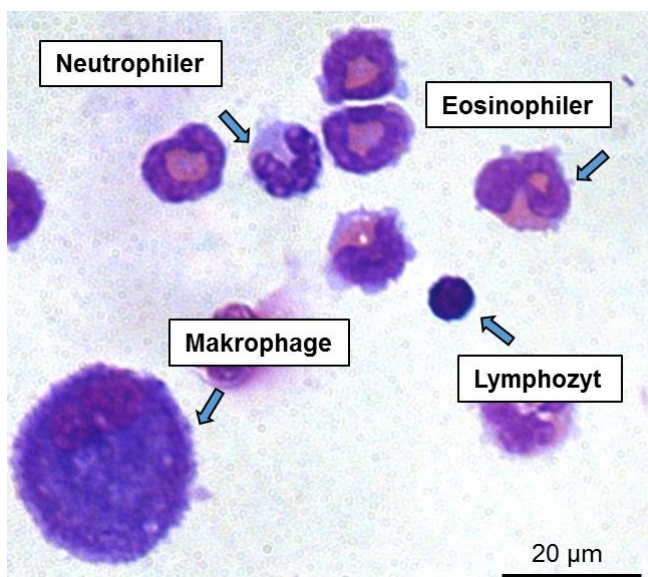


Abb. 3.2: BAL-Zytospot einer OVA-Maus gefärbt nach May-Grünwald-Giemsa
 Exemplarisch dargestellt sind die vier verschiedenen, differenzierten Zelltypen: Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophile und Neutrophile.

In der PBS-Kontrollgruppe zeigte sich eine Dominanz von Alveolarmakrophagen ($98,41 \pm 0,71\%$), während die anderen Zelltypen nur in sehr geringen Maße (Lymphozyten: $1,59 \pm 0,71\%$) bzw. gar nicht (Eosinophile und Neutrophile: 0%) vertreten waren (Tab. 3.2, 3.3; Abb. 3.3, 3.4). Die prozentualen Anteile der einzelnen Zelltypen in der BAL der PBS-Gruppe zeigte dementsprechend ein physiologisches Verteilungsmuster. Aus der Differentialzytologie ging des Weiteren hervor, dass die hohe GZZ der mit OVA behandelten Tiere v.a. auf die Zunahme der Eosinophilen zurückzuführen war. Dieser Zelltyp zeigte einen signifikanten Anstieg gegenüber der PBS-Kontrollgruppe ($74,37 \pm 15,61\%$ (OVA) vs. $0 \pm 0\%$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test) und dominierte in der BAL der OVA-Gruppe. Auch der Anteil der Lymphozyten und Neutrophilen zeigte in der BAL der OVA- im Vergleich zur PBS-Gruppe einen signifikanten Zuwachs ($6,44 \pm 3,51\%$ (OVA) vs. $1,59 \pm 0,71\%$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test) und ($2,26 \pm 0,99\%$ (OVA) vs. $0 \pm 0\%$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test). Der prozentuale Anteil der Alveolarmakrophagen nahm in der OVA-Gruppe entsprechend signifikant ab ($16,39 \pm 0,71\%$ (OVA) vs. $98,41 \pm 0,71\%$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test). Bei Betrachtung der absoluten Zahlenwerte der Makrophagen ist jedoch zu erkennen, dass sich die absolute Anzahl dieses Zelltyps in den beiden Untersuchungsgruppen kaum unterscheidet ($22,06 \pm 5,38$ (OVA) vs. $28,32 \pm 18,28$ (PBS), n.s., U-Test) (Tab. 3.2, 3.3; Abb. 3.3, 3.4).

Tab. 3.2	OVA	PBS
Makrophagen	$22,06 \pm 5,38$ n.s.	$28,32 \pm 18,28$
Lymphozyten	$11,01 \pm 7,84$ *	$0,50 \pm 0,51$
Eosinophile	$139,87 \pm 93,35$ *	0 ± 0
Neutrophile	$4,42 \pm 3,28$ *	0 ± 0

Tab. 3.3	OVA	PBS
Makrophagen	$16,39 \pm 15,52\%$ *	$98,41 \pm 0,71\%$
Lymphozyten	$6,44 \pm 3,51\%$ *	$1,59 \pm 0,71\%$
Eosinophile	$74,37 \pm 15,61\%$ *	0%
Neutrophile	$2,26 \pm 0,99\%$ *	0%

Tab. 3.2 und 3.3: Differentialzytologie der BAL nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Differentialzytologie als absolute Werte und in Prozent. Pro BAL wurden ca. 500 Zellen differenziert und daraus das prozentuale Verteilungsmuster der Leukozytenpopulation ermittelt (Tab. 3.3). Die absoluten Zellzahlen sind in ($\times 10^4$) pro BAL angegeben und wurden aus der GZZ und dem prozentualen Anteil der jeweiligen Leukozytenpopulation errechnet (Tab. 3.2). $n = 15$ /Gruppe, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, U-Test. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf einen Vergleich mit der PBS-Kontrolle.

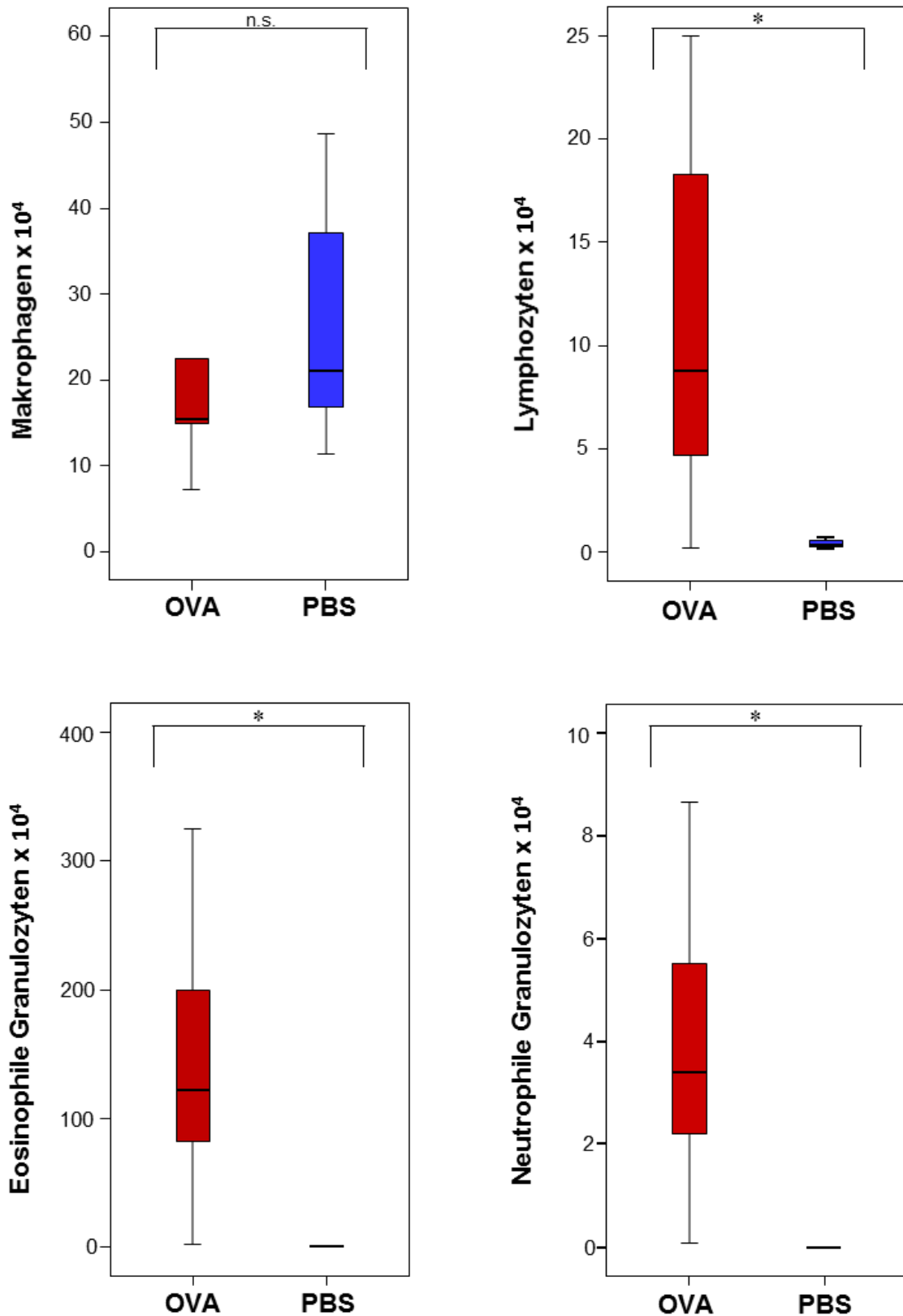


Abb. 3.3: Differentialzytologie der BAL von Mäusen nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation
 Die absoluten Zellzahlen werden in ($\times 10^4$) pro BAL angegeben. n = 15/Gruppe, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, U-Test.

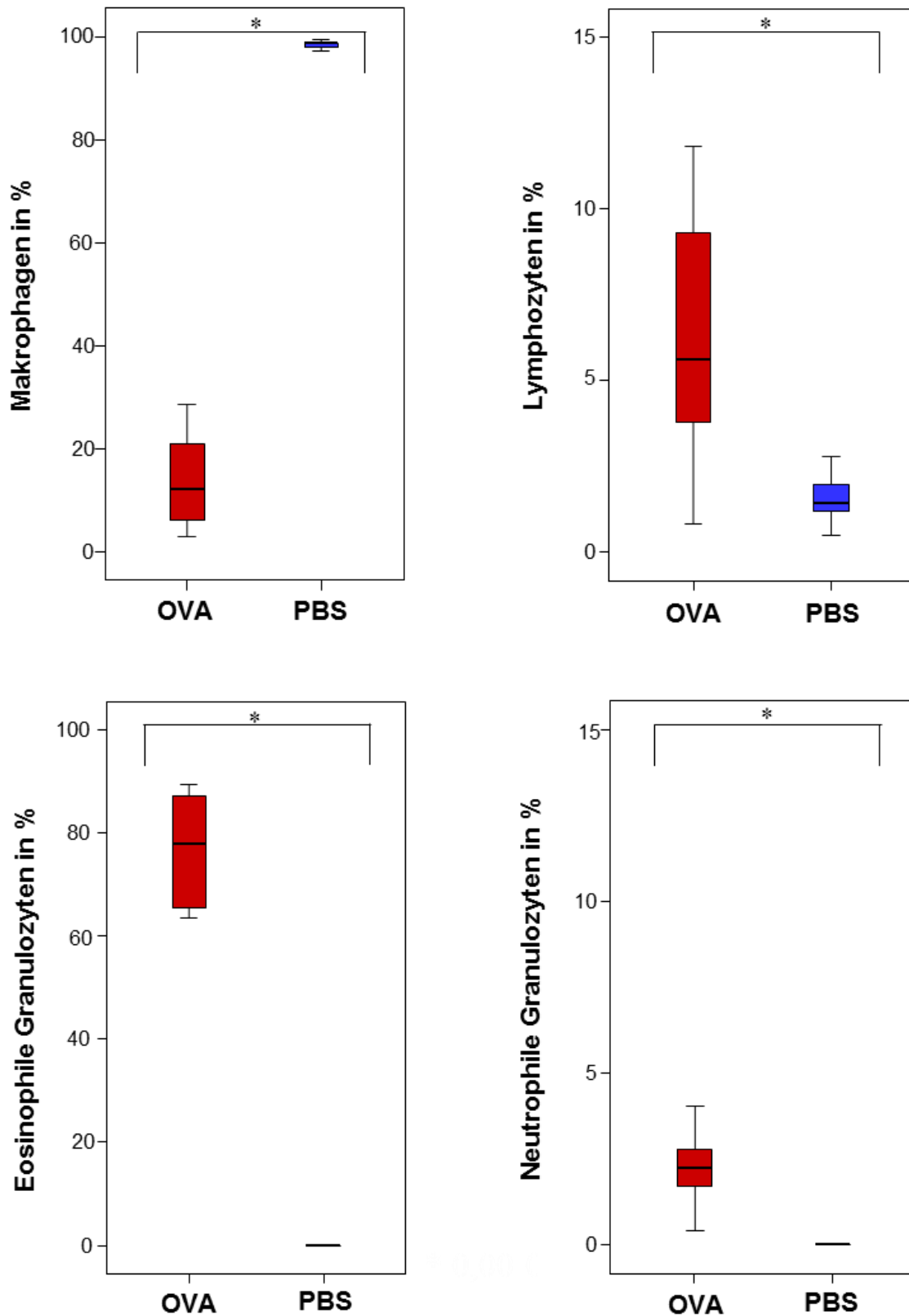


Abb. 3.4: Differentialzytologie der BAL von Mäusen nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation in Prozent

Pro BAL wurden ca. 500 Zellen differenziert und daraus die prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen bestimmt. n = 15/Gruppe, *p ≤ 0,05, U-Test.

3.1.2 Histologie der Lunge

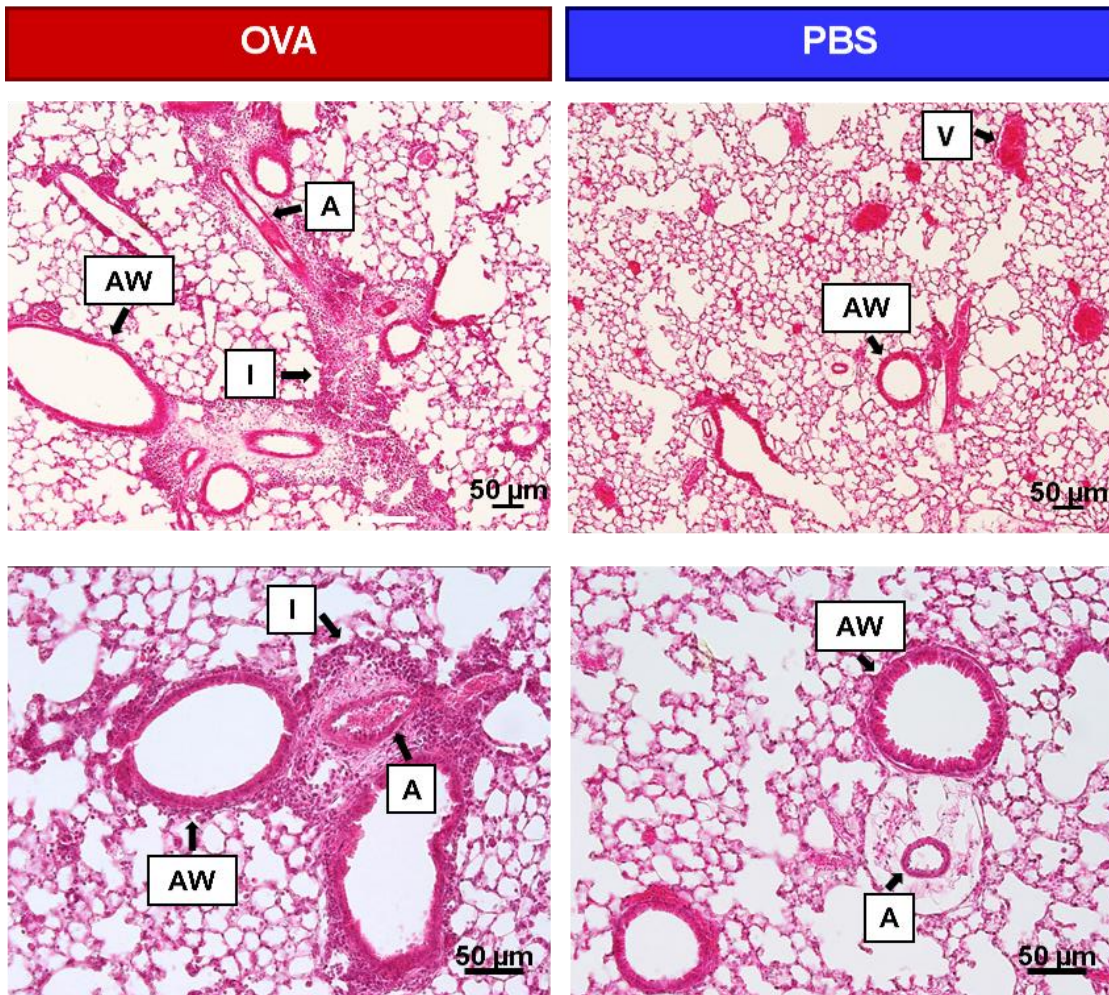
Um histopathologische Veränderungen in den Mauslungen nachweisen zu können, wurden verschiedene Färbungen vorgenommen und qualitativ beurteilt.

3.1.2.1 H.E.-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation

Die histologische Untersuchung der PBS-Gruppe wies einen Normalbefund ohne Hinweis auf eine Atemwegsentzündung auf: Die Alveolarsepten zeigten sich zart, das Epithel der Bronchioli war zylindrisch bis kubisch. Die begleitenden Arterien zeigten ein plattes Endothel mit zarter Muskelschicht. Es war kein entzündliches Infiltrat zu erkennen (Abb. 3.5). C57Bl/6 Mäuse nach OVA-Aerosol-Provokation präsentierten ein deutliches perivaskuläres und peribronchiales entzündliches Zellinfiltrat (Abb. 3.5).

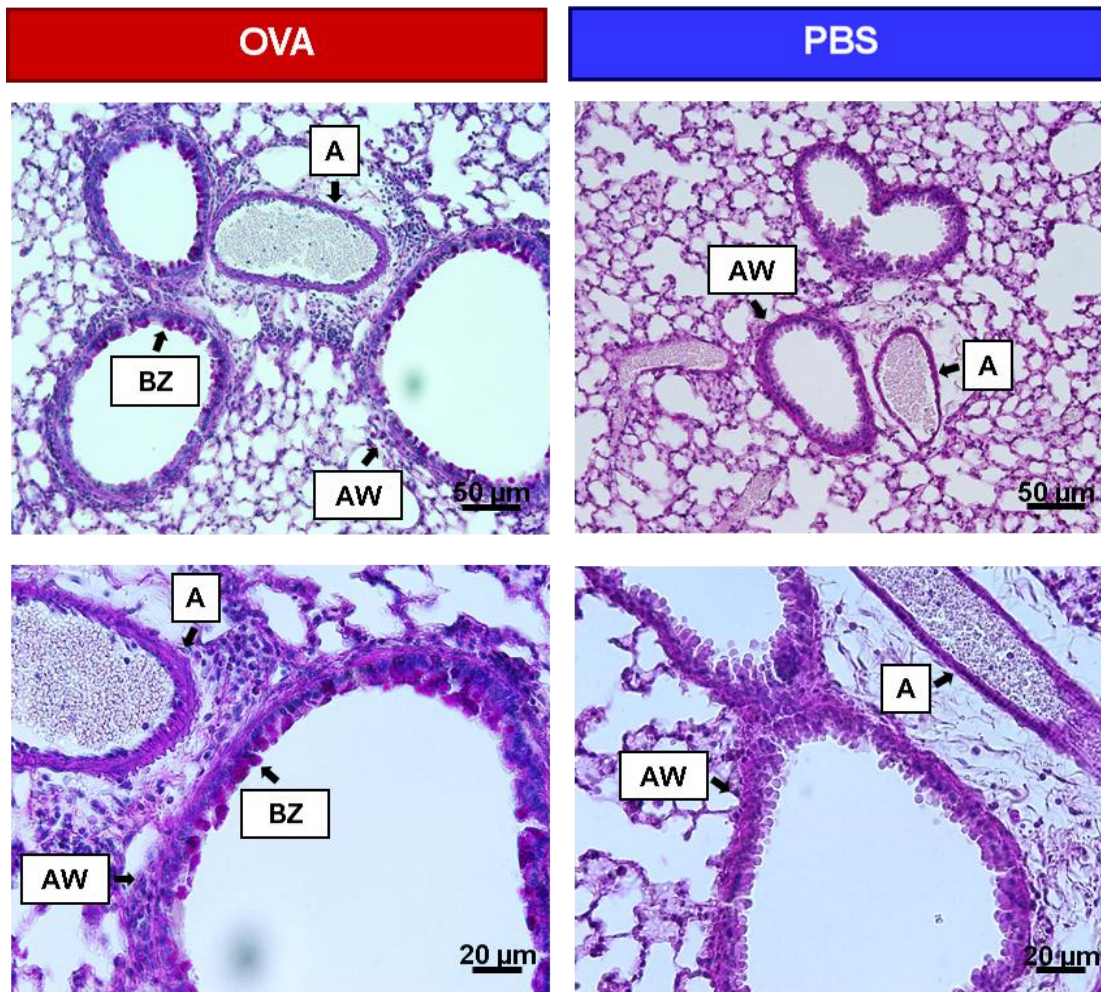
3.1.2.2 PAS-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation

In der PBS-Gruppe waren im Epithel der Bronchiolen keine mukusproduzierenden Zellen nachweisbar (Abb. 3.6). Die Abwesenheit von submukösen Drüsen sowie Becherzellen in den peripheren Luftwegen der Maus sind Merkmale, die als physiologisch zu betrachten sind, und bestätigen, dass im Rahmen der PBS-Aerosol-Exposition keine krankhaften Veränderungen stattgefunden haben (Pavelka et al. 1976; Rock et al. 2010; Hayashi 2012). In den histologischen Schnittbildern von Tieren nach OVA-Aerosol-Exposition waren im Epithel der Bronchiolen intraepithelial gelegene, rot-violette Zellen zu erkennen, welche als Becherzellen identifiziert wurden (Abb. 3.6). Die Meta- und Hyperplasie als histopathologisches Kriterium der allergischen Atemwegsinflammation untermauert die erfolgreiche Induktion einer bronchopulmonalen Inflammation im Rahmen der OVA-Aerosol-Provokation.



**Abb. 3.5: H.E.-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-
Provokation**

Die Abbildung zeigt perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate in den Mäuselungen nach OVA-Aerosol-
Provokation. A = Pulmonalarterie, AW = Atemweg, I = Infiltrat, V = Pulmonalvene.



**Abb. 3.6: PAS-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-
Provokation**

Die Abbildung zeigt eine Vermehrung von Becherzellen in den Atemwegen der Mauslunge nach OVA-Aerosol-
Provokation. A = Pulmonalarterie, AW = Atemweg, BZ = Becherzelle.

3.1.2.3 Masson-Goldner-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation

Im Lungengewebe der PBS-Kontrollgruppe konnte eine normale, geringe Kollagendeposition nachgewiesen werden (Abb. 3.7). Auch in der OVA-Gruppe war noch kein Zuwachs an kollagenen Bindegewebe im Sinne eines *Airway Remodeling* auszumachen (Abb. 3.7). Wie auch schon in der H.E.-Färbung beobachtet, zeigten sich in den Schnittbildern der OVA-Gruppe deutliche Entzündungsinfiltrate (Abb. 3.7).

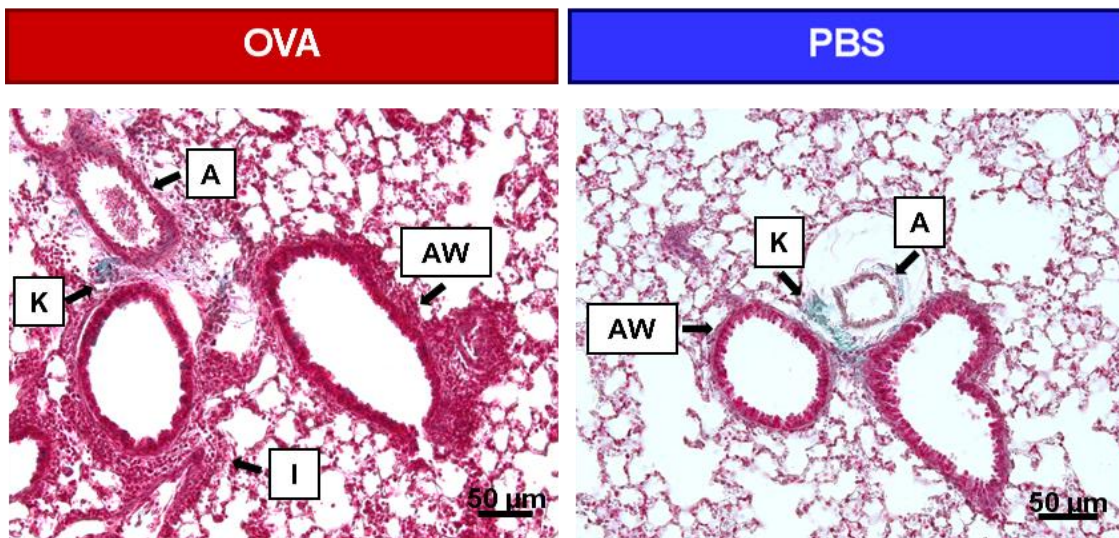


Abb. 3.7: Masson-Goldner-Färbung an Paraffinschnitten der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosol-Provokation

Die Abbildung zeigt eine physiologische Kollagendeposition in beiden Untersuchungsgruppen. Zu erkennen ist weiterhin das entzündliche perivaskuläre und peribronchiale Infiltrat in der OVA-Gruppe. A = Pulmonalarterie, AW = Atemweg, I = Infiltrat, K = Kollagen.

3.2 Nachweis der FGFR in atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum

3.2.1 FGFR-mRNA-Expression in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum

Zunächst sollte untersucht werden, welche FGFR von bronchopulmonalen vagalen C-Faser-Neuronen exprimiert werden und inwieweit eine Regulation des Expressionsprofils im Rahmen der Allergenprovokation festzustellen ist.

Als erste orientierende Untersuchung wurde die mRNA-Expression der FGFR an kompletten JNGs von C57BL/6 Mäusen getestet. Es wurden pro Rezeptor jeweils drei verschiedene Primerpaare konzipiert. In diesen Vorversuchen zeigte sich eine regelmäßige Expression von FGFR1, 2 und 3. FGFR4 konnte mit keinem der drei Primer nachgewiesen werden (Abb. 3.8). In cDNA aus der Mauslunge konnte eine Expression von FGFR4 dokumentiert werden (Positivkontrolle), sodass die Funktionalität des Primers gesichert war.

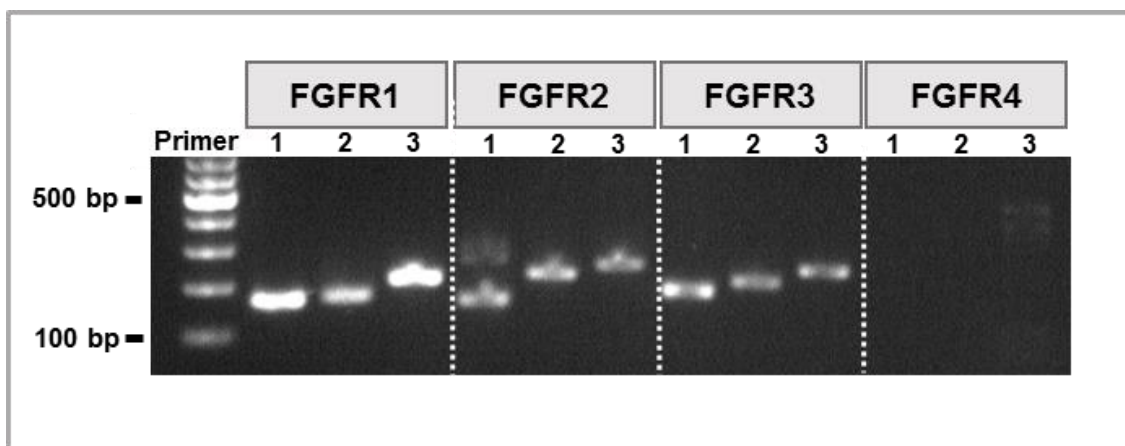


Abb. 3.8 FGFR-mRNA-Expression in cDNA von JNG, RT-PCR, Agarose-Gelelektrophore
Pro Rezeptor wurden drei verschiedene Primer getestet. Die FGFR1-3 konnten mit allen getesteten Primern nachgewiesen werden; FGFR4 wurde nicht detektiert.
Produktgrößen: FGFR1 Primer 1: 164 bp, 2: 166 bp, 3: 206 bp, FGFR2 Primer 1: 165 bp, 2: 212 bp, 3: 235 bp, FGFR3 Primer 1: 179 bp, 2: 204 bp, 3: 233 bp, FGFR4 Primer 1: 152 bp, 2: 228 bp, 3: 299 bp.

Da sich im JNG neben sensorischen C-Faser-Neuronen auch andere Zelltypen wie Glia-, Endothel-, oder glatte Muskelzellen der Gefäße etc. befinden, konnten anhand dieser Ergebnisse noch keine Rückschlüsse auf das Expressionsmuster einzelner bronchopulmonaler C-Faser-Neurone geschlossen werden.

Daher wurde im nächsten Schritt die Präsenz der FGF-Rezeptoren 1-4 auf

Einzelzellebene untersucht. Die bronchopulmonalen Afferenzen aus dem JNG konnten nach intratrachealer Tracerapplikation anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert und isoliert werden. Im nachfolgenden Schritt wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und anschließend jede einzelne Zelle mit der *single-cell* RT-PCR auf die Expression des *housekeeping gene* β -Aktin getestet.

Neben den unmyelinisierten C-Fasern sind außerdem noch schnell leitende, myelinisierte A-Fasern an der afferenten Versorgung der Lunge beteiligt (Belvisi 2002). Da in der Studie ausschließlich die C-Faser-Neurone untersucht werden sollten, mussten die gepickten Zellen im nachfolgenden Schritt anhand spezifischer Marker zunächst als solche identifiziert werden. Die cDNA wurde dafür auf die Expression des speziell von afferenten C-Faser-Neuronen gebildeten Kationenkanals TRPV1 getestet (Caterina et al. 1997). Es sollten weiterhin ausschließlich die dem Ggl. nodosum entstammenden Nervenzellen untersucht werden. Dessen embryonaler Ursprung liegt in der epibranchialen Plakode. Sie machen in der Maus ca. 90% aller C-Faser-Neurone im JNG aus. Zu deren Charakterisierung verwendeten wir den Marker P2X2, welcher als spezifisch für C-Faser-Neurone plakodalen Ursprungs beschrieben wurde (Nassenstein et al. 2010).

Die für TRPV1 und P2X2-mRNA positiv getesteten Zellen konnten im Anschluss mit Hilfe spezifischer intronspannender Primer in 50 Amplifikationszyklen auf die Ausprägung der vier verschiedenen FGFR geprüft werden.

Das Expressionsprofil von 20 positiven Einzelzellen aus der OVA-Gruppe wurde dabei dem von 20 Einzelzellen aus Tieren der gesunden PBS-Kontrollgruppe gegenübergestellt und stellte sich wie folgt dar:

In 12 von 20 Zellen aus der OVA-Gruppe konnte mRNA für den FGFR1 nachgewiesen werden (60%). In der entsprechenden PBS-Kontrollgruppe waren 11 von 20 Zellen (55%) positiv für den FGFR1. Es konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (12 von 20 (OVA) vs. 11 von 20 (PBS), n.s., χ^2 -Test). Der FGFR2 wurde von lediglich einer Zelle (5%) der PBS-Gruppe exprimiert. Keine der untersuchten Zellen zeigte eine FGFR3- oder FGFR4 mRNA-Expression (Abb. 3.9). Alle PCR-Produkte wurden als einzelne Banden in der erwarteten Produktgröße detektiert.

3.2.2 mRNA-Expression der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante

Durch alternatives Spleißen der Exone, welche die C-terminale Hälfte der Immunglobulinähnlichen Domäne 3 kodieren, entstehen drei verschiedene Spleißvarianten (IIIa, IIIb und IIIc) des FGFR1. Diese unterscheiden sich funktionell durch distinkte Ligandenbindungsspezifitäten für nur bestimmte FGFs (Werner et al. 1992; Ornitz et al. 1996). Nachdem mittels RT-PCR analysiert wurde, dass lediglich der FGFR1 konstitutiv in atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen exprimiert wird, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, welche Variante des FGFR1 vorwiegend vorhanden ist, und ob es Unterschiede im Expressionsmuster zwischen Tieren mit und ohne allergischer Atemwegsentzündung gibt. Da es sich bei der FGFR1 IIIa-Variante um einen löslichen Rezeptor ohne Tyrosinkinaseaktivität handelt (Johnson et al. 1991), wurde dieser in den Versuchen nicht mit berücksichtigt.

Zunächst sollte geklärt werden, wie sich die Nukleotidstruktur der beiden Varianten voneinander unterscheiden. Im *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), einer Datenbank die dem Abgleich biologischer Sequenzen dient, konnten jedoch keine zuverlässigen, den IIIb- und IIIc-Varianten zugehörigen Sequenzdaten ausfindig gemacht werden. In der Literatur über FGFR1 und seine Spleißvarianten ergaben sich Hinweise darauf, dass die Unterscheidung zwischen den Varianten mit Hilfe eines Restriktionsenzymverdau möglich ist (Pasumarthi et al. 1995; Jin et al. 1994). Jede DNA hat aufgrund ihrer spezifischen Sequenz eine individuelle Verteilung von Erkennungsbereichen für solche Restriktionsenzyme. Durch deren Einsatz wird die DNA in verschieden große Fragmente geschnitten, die nach elektrophoretischer Auftrennung ein charakteristisches Bandenmuster ergeben. Das Restriktionsenzym AccI spaltet die Nukleotidsequenz -GTAGAC-, welche spezifisch in der IIIc-, nicht aber in der IIIb-Variante vertreten ist. Für die RT-PCR wurde ein Primerpaar (D3) eingesetzt, das nach Angaben der Literatur die Immunglobulinähnliche Domäne 3 und die transmembrane Domäne flankiert und dabei beide Varianten erfasst. Wenn die IIIb-Variante vertreten ist, hat das PCR-Produkt eine Länge von 777 bp und ein Verdau mit AccI führt nicht zur Spaltung der DNA. Wenn die IIIc-Variante vorliegt, entsteht ein 786 bp langes Produkt, welches nach Verdau in ein 317 und ein 469 bp langes Fragment gespalten wird (Abb. 3.10) (Pasumarthi et al. 1995; Jin et al. 1994).

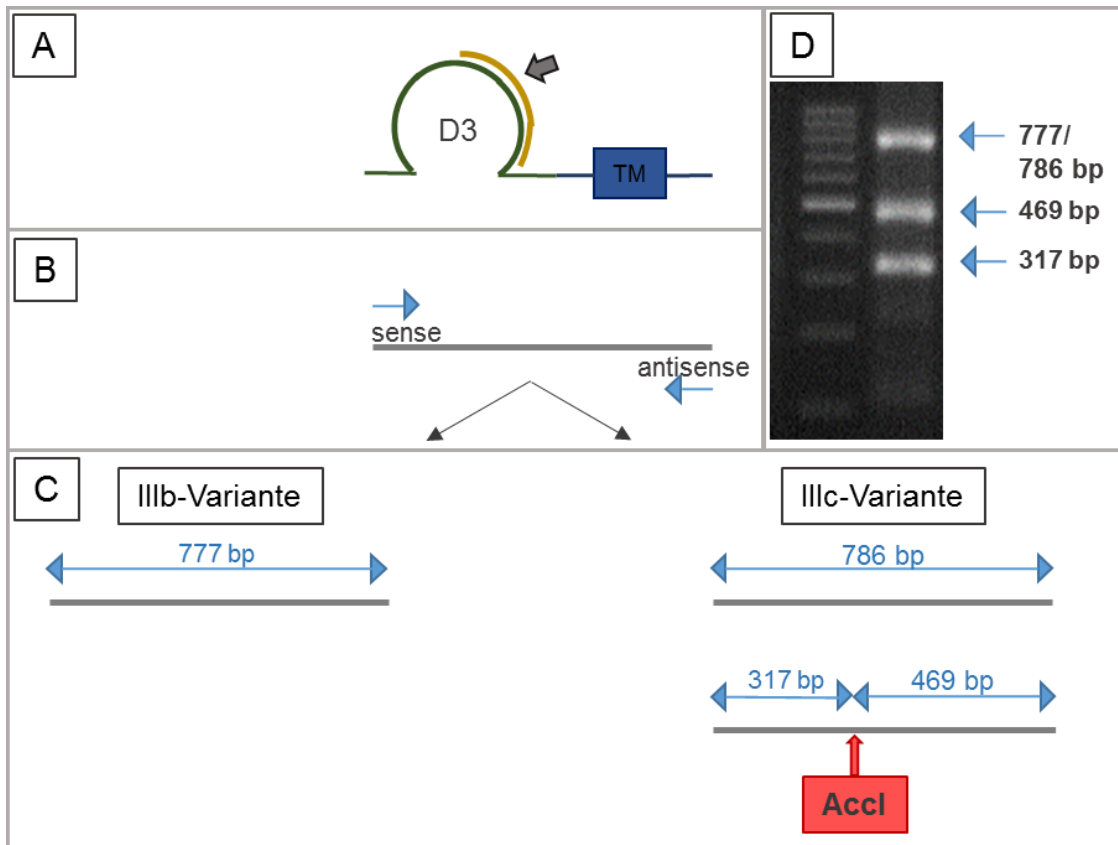


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Differenzierung zwischen der IIIb- und IIIc-Variante des FGFR1 anhand des Restriktionsenzym AccI

A) Struktur der immunglobulinähnlichen Domäne 3; der Pfeil markiert deren C-terminale Hälfte, welche durch das alternative Spleißen modifiziert wird.
 B) Primerhybridisierung; der Primer D3 flankiert den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt, der u.a. die C-terminale Hälfte der Domäne 3 kodiert.
 C) Differenzierung der Varianten durch die restriktionsenzymatische Spaltung mit AccI; die IIIb-Variante wird durch Verdau mit AccI nicht geschnitten und die Produktlänge beträgt 777 bp. Die IIIc-Variante wird durch Verdau mit AccI in zwei Fragmente gespalten, die Länge des Ursprungsproduktes beträgt 786 bp.
 D) Exemplarisch dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes nach Amplifikation mit dem Primer D3 und anschließender restriktionsenzymatischer Spaltung; die eingesetzte cDNA entstammt dem Mausehirn. Eigene Abbildung, inhaltlich angelehnt an (Pasumarthi et al. 1995).

Aufgrund der Produktgröße (777 bp bzw. 786 bp) führte der Primer auf Einzelzell-Ebene nicht zuverlässig zu PCR-Produkten, sodass auch kein Restriktionsenzymverdau möglich war. Um die Expression der Varianten erfolgreich untersuchen zu können, mussten im folgenden Schritt auf Einzelzell-Ebene einsetzbare spezifische Primer kreiert werden. Grundlage dafür war das Wissen über die genauen Unterschiede in der Nukleotidsequenz der beiden Spleißvarianten. Die in der Literatur verwendete Primersequenz konnte nach Abgleich im BLAST in der Nucleotid Sequenz NM_001079908 *FGFR1 Transcript Variant 2* lokalisiert werden (Pasumarthi et al. 1995; Jin et al. 1994). Auch die Schnittstelle für AccI, -GTATAC-, konnte in der Nukleotidsequenz ausfindig gemacht werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich bei der Nukleotidsequenz

NM_001079908 *FGFR1 Transcript Variant 2* um die IIIc Variante handeln muss, da nur diese von *AccI* geschnitten wird.

Um im folgenden Schritt die Nukleotidabfolge der IIIb-Variante zu ermitteln, wurde das Verfahren der Sequenzierung angewendet. Literaturrecherchen sollten aufzeigen, in welchem Gewebe die IIIb-Variante vorwiegend exprimiert wird. Dabei wurde die Epidermis der Maus als Quelle ausfindig gemacht (Beer et al. 2000). cDNA muriner Keratinozyten (MSC-P5-Keratinozyten), die freundlicherweise von Prof. Wolfgang Bäumer vom Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit dem Primer D3 amplifiziert und das Produkt im Anschluss mit dem Restriktionsenzym *AccI* verdaut. Ein Teil des PCR-Produkts wurde in DNA-Fragmente geschnitten. Der dominierende Teil blieb jedoch unverdaut. Dieser Anteil wurde unter der Annahme, dass es sich dabei um die IIIb-Variante handle, ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend extern durch den Sequenzierungsservice von Qiagen sequenziert (Abb. 3.11).

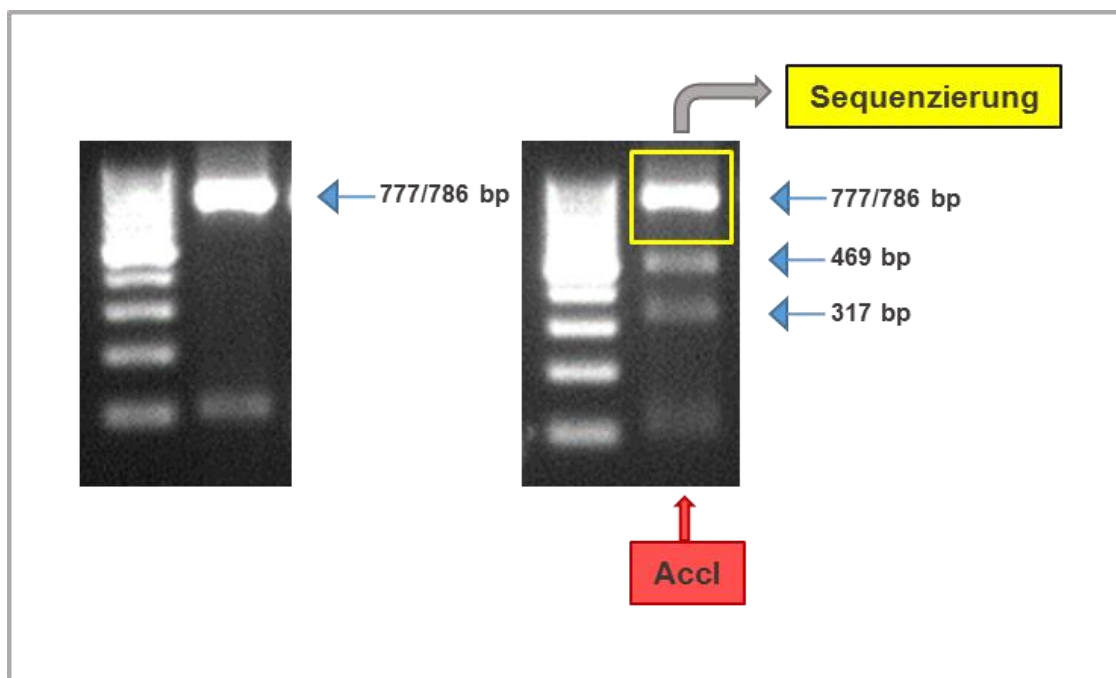


Abb. 3.11: Restriktionsenzymatische Spaltung der PCR-Produkte nach Amplifikation von Keratinozyten cDNA mit dem Primerpaar D3, Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RT-PCR-Produkte erfolgte in einem 2%igen Agarosegel. Links ist das unbehandelte PCR-Produkt, welches nach Amplifikation mit dem Primer D3 entstanden ist, zu erkennen. Das rechte Bild zeigt das PCR-Produkt nach Verdauung mit *AccI*. Ein Teil des Amplifikats wurde in Spaltprodukte mit der zu erwartenden Basenpaarlänge von 469 und 317 bp geschnitten (IIIc-Variante). Der überwiegende Teil blieb jedoch unverdaut. Bei diesem Produkt konnte es sich entweder um die gesuchte IIIb-Variante (777 bp), oder die ungeschnittene IIIc-Variante (786 bp) handeln. Um dies zu klären, wurde die im gelben Kasten markierte Bande ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend extern sequenziert.

Die sequenzierte Nucleotidabfolge wurde anschließend mit der bereits bekannten Sequenz der IIIc-Variante verglichen. Dabei zeigten die Nukleotide im Sequenzalignement vereinzelte Abweichungen. Vor allem enthielt sie jedoch statt der für die IIIc-Variante als charakteristisches Merkmal beschriebene AccI Bindungsstelle -GTATAC- die Nukleotide -GTATGT- (Abb. 3.12).

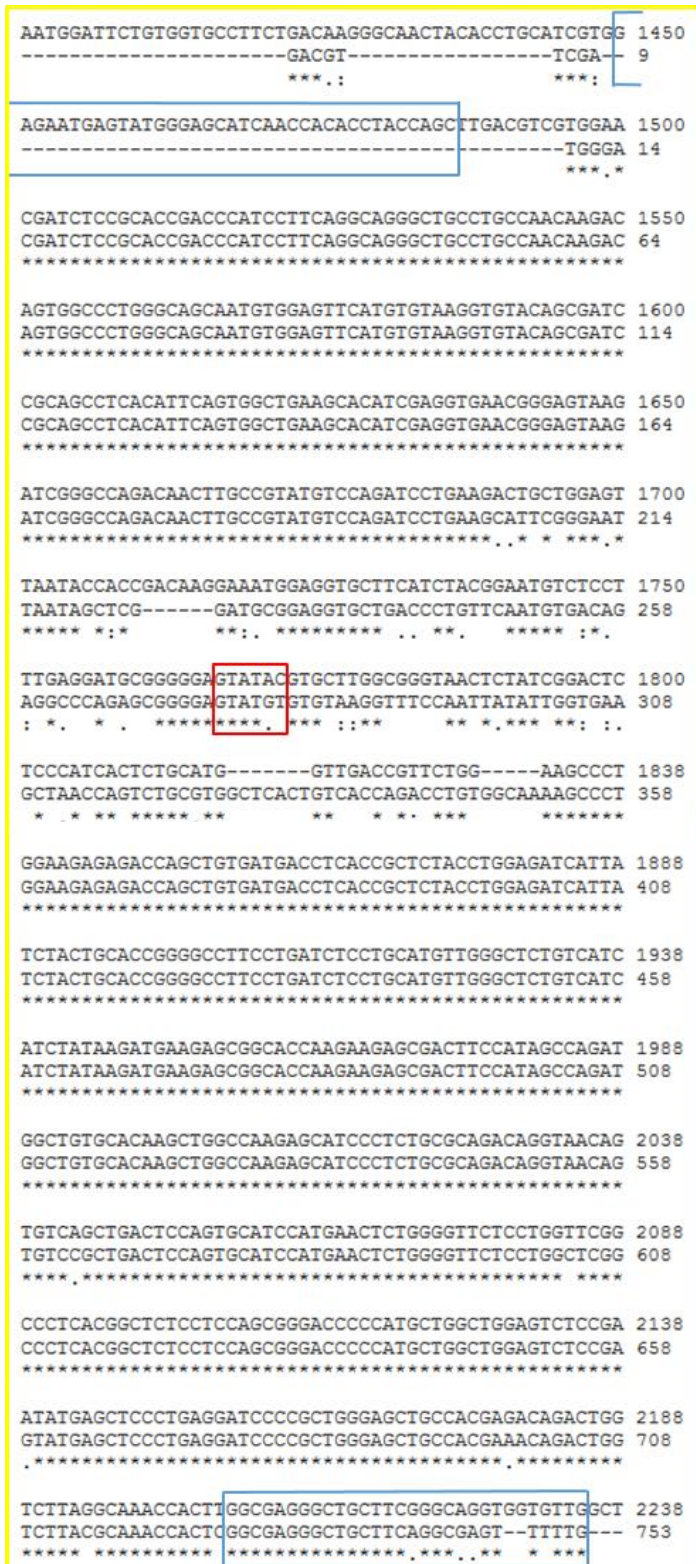


Abb. 3.12: Sequenzalignement der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante
 Vergleich der Nucleotidsequenz der FGFR1 IIIc-Variante (obere Reihe) und des sequenzierten PCR-Produkts aus Keratinozyten-cDNA (untere Reihe), welches der FGFR1 IIIb-Variante entspricht. Blauer Kasten: Forward- und Reverseprimer des Primerpaars D3. Roter Kasten: Erkennungssequenz des Restriktionsenzym AccI, welches nur in der IIIc-, nicht aber in der IIIb-Variante zu finden ist.

Auf der Grundlage des Sequenzalignments konnten nun für die nachfolgenden Experimente spezifische Primer für die FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante kreiert werden. Bevor diese in der *single-cell* RT-PCR an bronchopulmonalen, nodalen C-Faser-Neuronen eingesetzt wurden, sollte die Funktionalität der Primer zuvor in der RT-PCR an Positivkontrollen überprüft werden. Da davon ausgegangen werden konnte, dass die IIIb-Variante in Keratinozyten exprimiert wird, wurden die Primerpaare zum einen an Keratinozyten-cDNA getestet, zum anderen wurde cDNA aus dem kompletten JNG mit den Primerpaaren amplifiziert. Die Auswertung der RT-PCR-Analyse zeigte, dass sowohl die IIIb- als auch die IIIc- Variante in Keratinozyten und im JNG der Maus exprimiert werden (Abb. 3.13). Die PCR-Produkte stellten sich als isolierte Banden in der erwarteten Produktgröße dar.

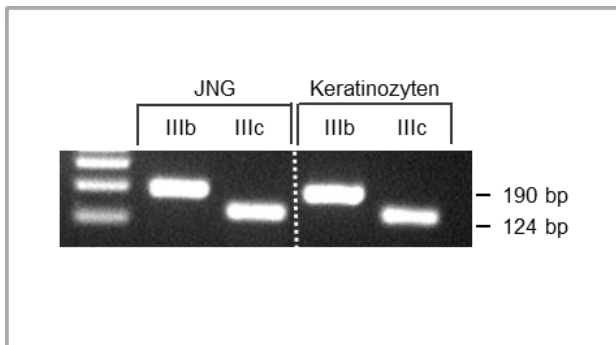


Abb. 3.13: Nachweis der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante in Keratinozyten-cDNA und JNG-cDNA der Maus, RT-PCR, Agarose-Gelelektrophorese
 Dargestellt sind die gelelektrophoretisch aufgetrennten RT-PCR-Produkte. Sowohl in Keratinozyten als auch in JNG der Maus konnten die FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante detektiert werden.

Im JNG wurden beide Varianten des FGFR1 nachgewiesen. Da sich in dem JNG neben den zu untersuchenden bronchopulmonalen, nodalen C-Faser-Neuronen auch andere Zelltypen befinden, konnte an dieser Stelle noch keine genaue Aussage darüber getroffen werden, welche Variante bzw. Varianten des FGFR1 im Speziellen von den C-Faser-Neuronen exprimiert werden. Um ausschließlich das Expressionsmuster der C-Faser-Neurone des Ggl. nodosum untersuchen zu können, sollte im nächsten Schritt die Einzelzellanalyse mit der *single-cell* RT-PCR erfolgen. Jeweils 5 FGFR1 positiv getestete, bronchopulmonale, nodale C-Faser-Neurone aus der OVA- und der PBS-Gruppe wurden auf die Expression der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante untersucht. In der PBS-Gruppe konnte in 3 von 5 FGFR1 positiven Zellen eine Expression von der IIIc-Variante nachgewiesen werden (60%). In der OVA-Gruppe waren 4 von 5 Zellen positiv für die IIIc-Variante (80%), sodass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigte (3 von 5 (PBS) vs. 4 von 5 (OVA), n.s., χ^2 -Test). Keine Zelle exprimierte die IIIb-Variante (Abb. 3.14). Die PCR-Produkte wurden als einzelne Banden in der jeweils erwarteten Produktgröße detektiert.

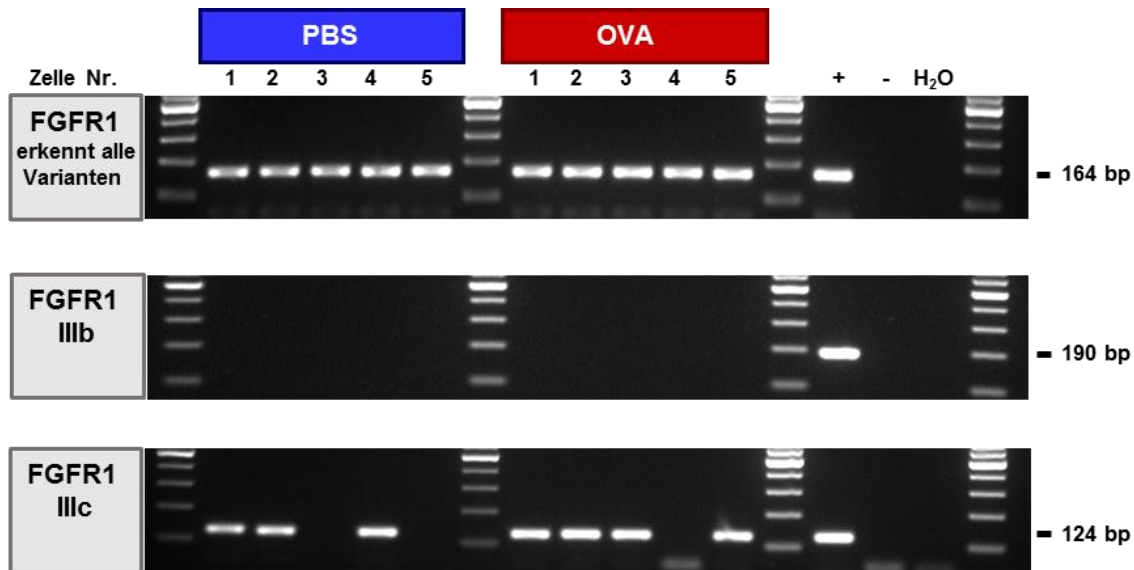


Abb. 3.14: mRNA-Expression der FGFR1 IIIb- und IIIc-Variante in bronchopulmonalen, nodalen C-Faser-Neuronen, *single-cell* RT-PCR, Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe spezifischer Primer wurde in FGFR1 positiv getesteten, bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum anhand der *single-cell* RT-PCR untersucht, welche Spleißvariante des FGFR1 vorwiegend exprimiert wird. Die repräsentative Darstellung der PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigt, dass in beiden Versuchsgruppen ausschließlich die IIIc-Variante nachzuweisen war. (+) = Positivkontrolle (FGFR1 IIIb: Keratinozyten, FGFR1 IIIc: JNG), (-) = -RT Kontrolle, H₂O = Wasserkontrolle.

3.2.3 Western Blot Analyse von FGFR1 in JNG

Der Nachweis des FGFR1 im JNG sollte im Anschluss auf Proteinebene erfolgen. Dafür wurde das Verfahren der Western Blot Analyse angewendet. Der eingesetzte Antikörper zeigte in den Gewebelysaten sowie in den vom Hersteller angegebenen Positivkontrollen ein unspezifisches Bandenmuster (Abb. 3.15). Daher musste der Antikörper als unspezifisch betrachtet werden.

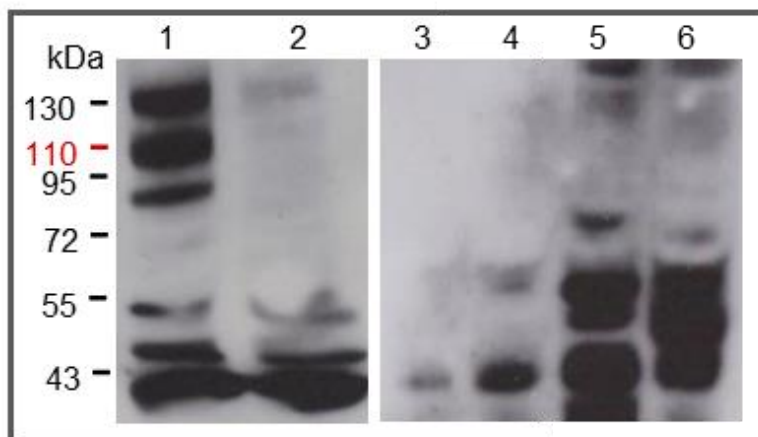


Abb. 3.15 Western Blot-Analyse von FGFR1

Zur Testung des Antikörpers wurden zwei Positivkontrollen, MOLT-4 Cell Lysate (1) und HeLa Whole Cell Lysate (2), durchgeführt. Das molekulare Gewicht des FGFR1 liegt bei 110 kDa. In den Lysaten von JNG (3), DRG (4), Milz (5) und Lunge (6) wurde keine Bande auf der erwarteten Höhe detektiert. Es zeigt sich ein unspezifisches Bandenmuster. 7,5%iges SDS-Gel, 20 µg Gesamtprotein pro Spur, Konzentration des Primärantikörpers gegen FGFR1: 0,7 µg/ml.

3.3 Nachweis von FGFs in der Mauslunge

Die Expression der FGFR1 IIIc-Variante in atemwegsinnervierenden C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum konnte anhand der *single-cell* RT-PCR sicher nachgewiesen werden. Im folgenden Schritt sollte daher die Expression der FGFR1 IIIc-Bindungspartner in den Lungen von C57BL/6 Mäusen untersucht werden.

In der Literatur werden 14 potenziell mögliche Liganden aus fünf verschiedenen FGF-Subfamilien für die FGFR1 IIIc-Variante beschrieben (Abb. 3.16) (Ornitz et al. 1996; Zhang et al. 2006).

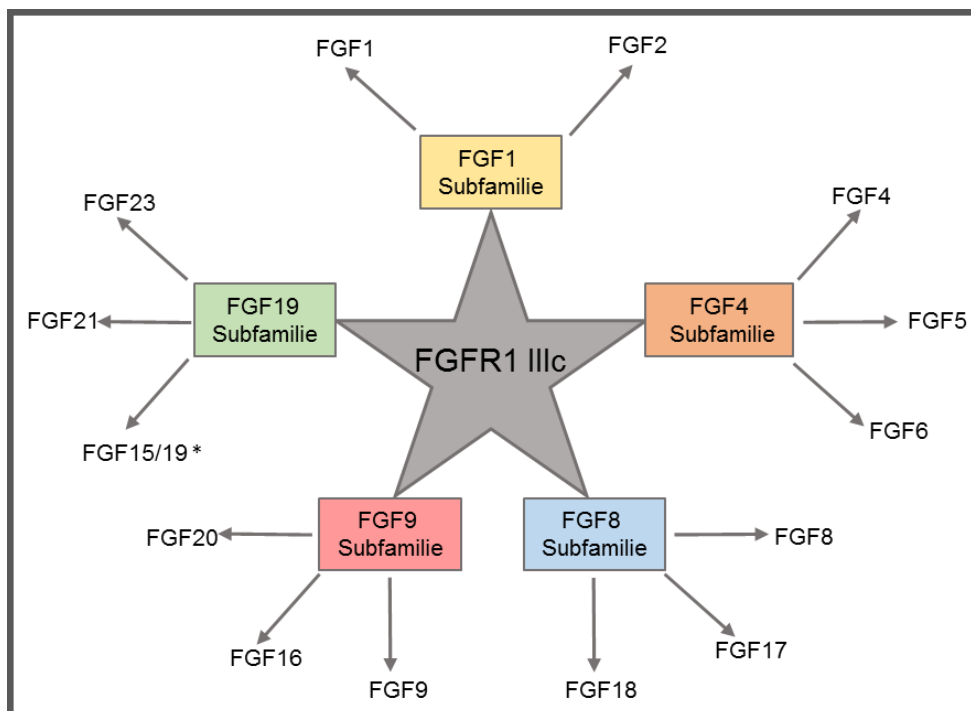


Abb. 3.16: Bindungspartner der FGFR1 IIIc-Variante

* Es wird davon ausgegangen, dass das humane FGF19 ortholog zum FGF15 der Maus ist (Itoh 2007). Eigene Abbildung, inhaltlich angelehnt an (Ornitz et al. 1996; Zhang et al. 2006).

3.3.1 mRNA-Expression von Liganden der FGFR1 IIIc-Variante in der Mauslunge mit und ohne allergischer Atemwegsentzündung

Die Expression der FGFR1 IIIc-Bindungspartner in den Lungen von C57BL/6 Mäusen wurde zuerst mit Hilfe der *standard* RT-PCR untersucht. Dabei galt es zu klären, ob eine Atemwegsentzündung qualitativen und quantitativen Einfluss auf die Expression der FGFs hat.

3.3.1.1 Qualitative RT-PCR-Analyse

Zunächst wurden mit dem Primer Design-Programm „Primer3“ für alle FGFs jeweils drei verschiedene intronspannende Primer konzipiert. In der Literatur wurde recherchiert, in welchen Gewebe der Maus die zu untersuchenden FGFs exprimiert werden, um auf diesem Wege Positivkontrollen zur Testung der Primer zu gewinnen.

Um eine möglichst spezifische Bindung bei der Primerhybridisierung zu gewährleisten, wurden die Bedingungen für jeden Primer durch Variationen der MgCl₂-Konzentration bzw. der Annealingtemperatur optimiert. Einen Überblick über die Primersequenzen, Produktlängen, eingesetzte Annealingtemperaturen und MgCl₂-Konzentrationen ist der Tab. 9.1 im Anhang zu entnehmen. Pro Versuchsgruppe wurde aus jeweils 10 C57BL/6-Mauslungen RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Um den Erfolg der Aufarbeitung zu prüfen, wurden die Proben zunächst auf die mRNA-Expression des *housekeeping gene* β -Aktin getestet. Anschließend wurde die Expression der FGFR1 IIIc-Liganden in jeweils 10 Mäusen der OVA- bzw. der PBS-Gruppe untersucht, indem die cDNA (1:10 vorverdünnt) in 40-45 Zyklen im Mastercycler mit den entsprechenden Primern amplifiziert wurde. Das Expressionsprofil stellte sich wie folgt dar: Für FGF5, 8, 17 und 23 zeigten sich bereits in der qualitativen RT-PCR Unterschiede in der Anzahl positiv getesteter Lungen zwischen Tieren mit und ohne allergischer Atemwegserkrankung. FGF5 und 17 wurden nahezu konstitutiv (90%) in den Mäusen der gesunden Kontrollgruppe exprimiert, während die Expression in den Mäusen der mit OVA-provozierten Mäuse weniger stark ausgeprägt war (30%) (Abb. 3.17). Demzufolge kann ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der FGF5- und FGF17-positiv getesteten Lungen zwischen der OVA- und PBS-Gruppe festgehalten werden (3 von 10 (OVA) vs. 9 von 10 (PBS), $p \leq 0,05$, χ^2 -Test). Im Falle von FGF8 verhielt es sich ähnlich. Bezüglich der Anzahl der FGF8-positiv getesteten Lungen dominierte die PBS-Gruppe (80%) gegenüber der OVA-Gruppe (60%) (Abb. 3.17). Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (6 von 10 (OVA) vs. 8 von 10 (PBS), n.s., χ^2 -Test). Die mRNA-Expression für FGF23 war hingegen in Tieren mit allergischer Atemwegsinflammation nahezu konstant (90%), wohingegen weniger Tiere der gesunden Kontrollgruppe FGF23 exprimierten (40%) (Abb. 3.17). Auch in diesem Fall besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (9 von 10 (OVA) vs. 4 von 10 (PBS), $p \leq 0,05$, χ^2 -Test). FGF21 wurde in beiden Untersuchungsgruppen nahezu konstitutiv exprimiert (80% in der OVA-Gruppe und 100% in der PBS-Gruppe), sodass ein signifikanter qualitativer Unterschied nicht auszumachen war (8 von 10 (OVA) vs. 10

von 10 (PBS), n.s., χ^2 -Test). Jedoch zeigten die Tiere der OVA-Gruppe bei gleicher Menge der eingesetzten cDNA und identischer Zyklenzahl ein schwächeres Bandensignal (Abb. 3.17). Ein quantitativer Unterschied in der mRNA-Expression von FGF21 bei bestehender entzündlicher Atemwegsinflammation ist daher möglich, wurde aber im Rahmen dieser Studie nicht weiter untersucht.

Alle amplifizierten Gensequenzen wurden als einzelne Banden in der erwarteten Produktgröße detektiert. Keins der drei kreierte Primerpaare für FGF 4, 6, 15 und 20 führte in den getesteten Geweben, unter Variation der Primerbedingungen, zu spezifischen PCR-Banden, sodass diese FGFs im Rahmen der Studie nicht weiter analysiert wurden.

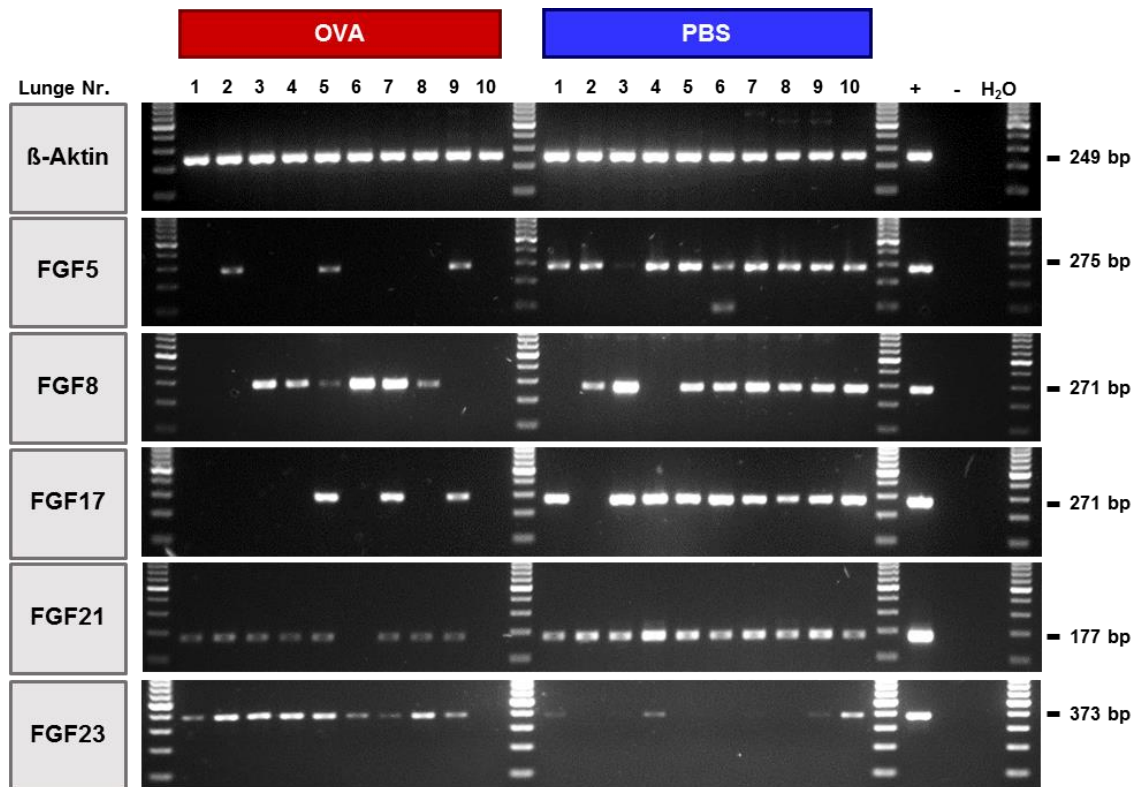


Abb. 3.17: mRNA-Expression der FGFR1 IIIc-Liganden in Lungen der OVA-Gruppe und PBS-Kontrollgruppe, RT-PCR, Agarose-Gelelektrophorese

Dargestellt sind die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte nach Amplifikation der cDNA mit spezifischen, intronspannenden Primern in 40-45 Zyklen. Die cDNA jeder einzelnen Lunge wurde zunächst auf die Expression des *housekeeping genes* β -Aktin getestet. Anschließend wurde die Expression der dargestellten FGF-Liganden in den beiden Versuchsgruppen untersucht. (+) = Positivkontrolle (FGF5: Gehirn, FGF8: 10,5 d altes Mausembryo, FGF17: Gehirn, FGF21: Leber, FGF23: Herzmuskulatur), (-) = - RT Kontrolle, H₂O = Wasserkontrolle.

3.3.1.2 Quantitative RT-PCR-Analyse

FGF1, 2, 9, 16 und 18 wurden in der RT-PCR konstitutiv in allen untersuchten Tieren exprimiert. Unterschiede im mRNA-Expressionslevel zwischen der OVA-Gruppe und der PBS-Kontrollgruppe sollten mittels quantitativer RT-PCR aufgezeigt werden. Jeweils 10 Tiere aus der OVA-Gruppe und 10 Tiere aus der PBS-Gruppe wurden getestet. Die Gensequenzen aller fünf Liganden wurden mittels spezifischer, intronspannender Primer in 45 Zyklen mit der quantitativen RT-PCR amplifiziert. Um Pipettierungenauigkeiten zu relativieren, wurde in jedem PCR-Durchlauf jeweils eine Dreifachbestimmung pro zu untersuchender Gensequenz vorgenommen. Die Spezifität des Amplifikats wurde zum einen durch die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel und zum anderen durch die Analyse der Schmelzkurven kontrolliert. Die PCR-Produkte wurden in der Gelelektrophorese als isolierte Banden auf Höhe der zu erwartenden Produktgröße detektiert. Es zeigten sich keine unspezifischen Produktbanden (Abb. 3.18).

Primerdimere können während der PCR mit der Synthese des spezifischen PCR-Produkts konkurrieren und somit die PCR-Effizienz reduzieren. Um diese auszuschließen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 3.19). Die Maxima in den Kurvenverläufen repräsentieren den charakteristischen Schmelzpunkt des amplifizierten PCR-Produkts bei dem nahezu zeitgleich alle dsDNA-Moleküle schmelzen und den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff wieder freigeben. Dies führt zu einem schlagartigen Abfall des registrierten Fluoreszenzsignals. Unspezifische PCR-Produkte wie Primerdimere benötigen aufgrund der abweichenden Anzahl der Wasserstoffbrückenbindung weniger thermische Energie um aufzuschmelzen, sodass sich diese als zweite Maxima bei einem niedrigeren Schmelzpunkt im Kurvenverlauf dargestellt hätten.

Um DNA-Kontaminationen in den einzelnen Komponenten des Mastermix auszuschließen, wurden begleitend Wasserkontrollen durchgeführt.

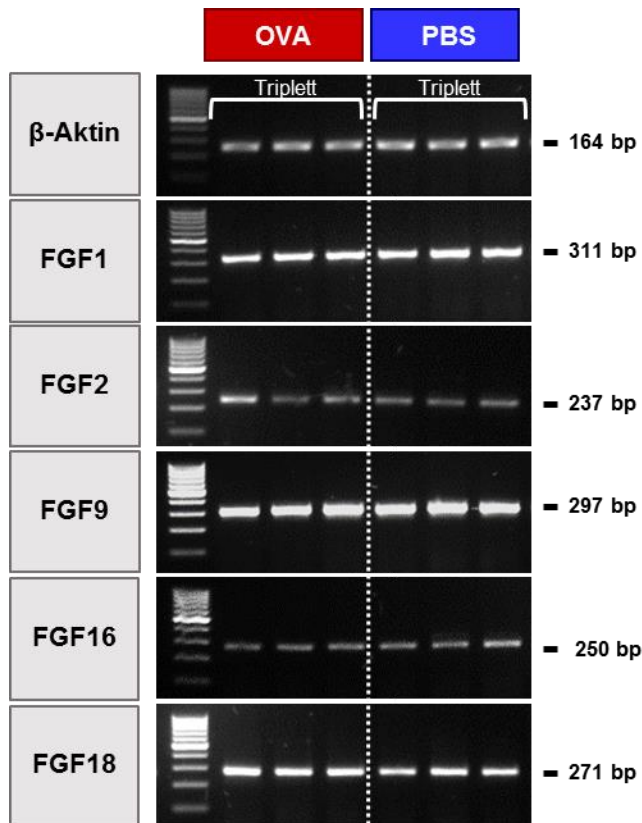


Abb. 3.18: Agarose-Gelelektrophorese der qRT-PCR-Produkte

Exemplarische Darstellung der Bandensignale nach elektrophoretischer Auftrennung der qRT-PCR-Produkte. Die eingesetzte cDNA wurde aus jeweils einer Lunge der OVA- und einer Lunge der PBS-Tiere hergestellt. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung von jeder untersuchten Zielsequenz. Die Bandensignale wurden auf der zu erwartenden Höhe lokalisiert; es waren keine unspezifischen PCR-Produkte zu erkennen.

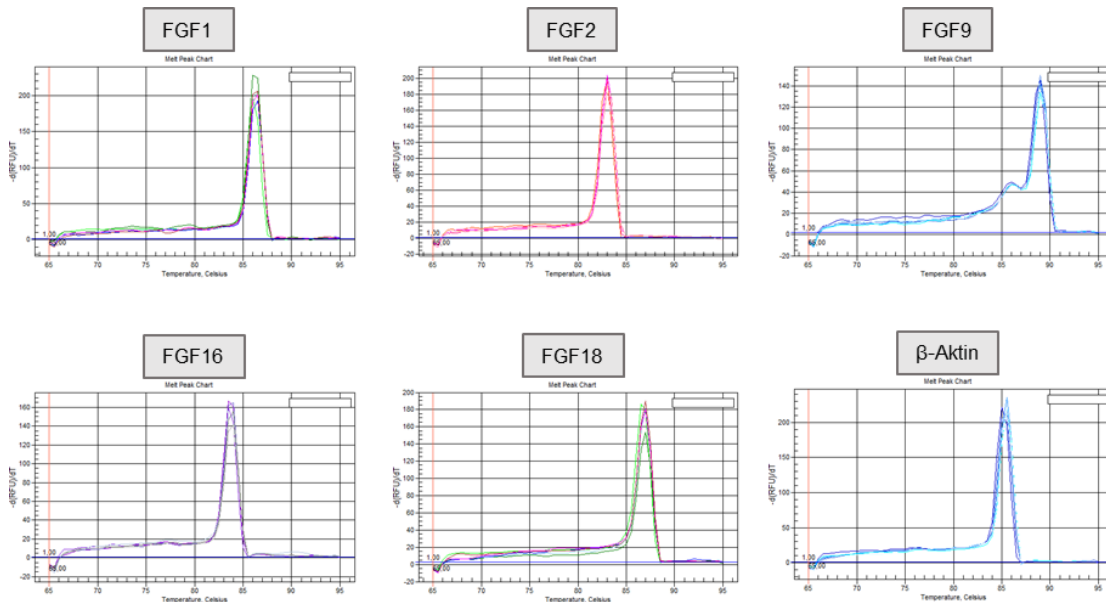


Abb. 3.19: Die Ableitung der Schmelzkurven

Exemplarische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse aus einem qRT-PCR-Durchlauf nach Amplifikation der FGFs und β-Aktin als Dreifachbestimmung in jeweils einer Lunge der OVA- und der PBS-Gruppe. Auf der Y-Achse ist die Fluoreszenzänderung pro Zeitintervall ($-d(RFU)/dt$) angegeben und auf der X-Achse die Temperatur in °C.

Die Ergebnisse wurden ausgehend vom Ct-Wert als relative Expressionslevel im Vergleich zum *housekeeping gene* β -Aktin dargestellt. Die mRNA-Menge von FGF1, 2 und 18 zeigt sich in allen Fällen allergeninduziert herabreguliert. Am deutlichsten ausgeprägt ist dies bei FGF1 zu erkennen, bei dem sich die relative Expression in der PBS-Gruppe 4,3 \times stärker gegenüber der OVA-Gruppe zeigte ($0,23 \pm 0,16$ (OVA) vs. $1,00 \pm 0,14$ (PBS), $p \leq 0,05$; U-Test). Bei FGF2 bzw. FGF18 war die relative Expression in der Kontrollgruppe im Verhältnis zur OVA-Gruppe 2,8 \times bzw. 2,6 \times stärker ausgeprägt ($0,36 \pm 0,13$ (OVA) vs. $1,00 \pm 0,20$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test), ($0,39 \pm 0,14$ (OVA) vs. $1,00 \pm 0,24$ (PBS), $p \leq 0,05$, U-Test). Die Expression von FGF9 präsentierte sich im Gegenzug in der OVA-Gruppe gegenüber der gesunden Kontrollgruppe 1,95 \times signifikant hochreguliert. Für FGF16 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($0,60 \pm 0,63$ (OVA) vs. $1,00 \pm 0,47$ (PBS), n.s., U-Test) (Tab.3.4, Abb. 3.20).

	OVA	PBS
FGF1	$0,23 \pm 0,16$ *	$1,00 \pm 0,14$
FGF2	$0,36 \pm 0,13$ *	$1,00 \pm 0,20$
FGF9	$1,95 \pm 1,03$ *	$1,00 \pm 0,24$
FGF16	$0,60 \pm 0,63$ (n.s.)	$1,00 \pm 0,47$
FGF18	$0,39 \pm 0,14$ *	$1,00 \pm 0,24$

Tab. 3.4: Relative mRNA-Expression von FGFs in Lungen der Maus nach OVA- und PBS-Aerosolprovokation

n = 10/Gruppe, * $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, U-Test. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf einen Vergleich mit der PBS-Kontrolle.

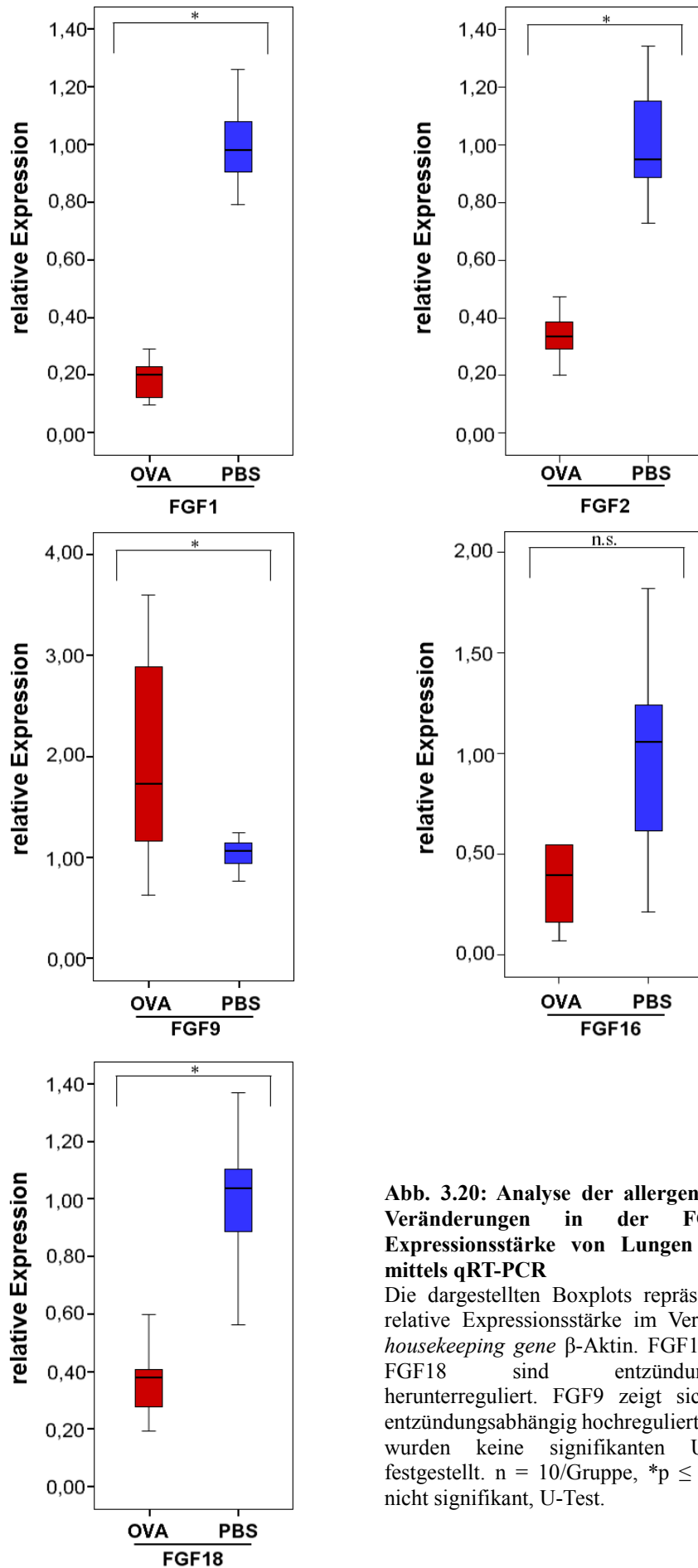


Abb. 3.20: Analyse der allergeninduzierten Veränderungen in der FGF-mRNA-Expressionsstärke von Lungen der Maus mittels qRT-PCR

Die dargestellten Boxplots repräsentieren die relative Expressionsstärke im Verhältnis zum *housekeeping gene* β -Aktin. FGF1, FGF2 und FGF18 sind entzündungsabhängig herunterreguliert. FGF9 zeigt sich hingegen entzündungsabhängig hochreguliert. Für FGF16 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. $n = 10/\text{Gruppe}$, $*p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, U-Test.

3.3.2 Western Blot-Analyse von FGFs in der Mauslunge mit und ohne allergische Atemwegsentzündung

Neben der mRNA Analyse sollten im nächsten Schritt die FGFs auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die konstitutiv in den Mauslungen exprimierte FGFs, welche in der qRT-PCR signifikante quantitative Unterschiede in der mRNA-Expressionsstärke zwischen Tieren mit und ohne Atemwegsinfektion aufwiesen, sollten nun mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot detektiert und quantifiziert werden.

Der Proteinnachweis von FGF1 und 18 konnte aufgrund einer Unspezifität der verwendeten Antikörper in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. In Vorversuchen zeigten sich die immundetektierten Banden auf einer Höhe, welche nicht mit dem Molekulargewicht des gesuchten Proteins zu vereinbaren war. Die Literatur lieferte keine zuverlässigen Hinweise auf im Western Blot etablierte Antikörper zur Detektion der Zielproteine (Abb. 3.21).

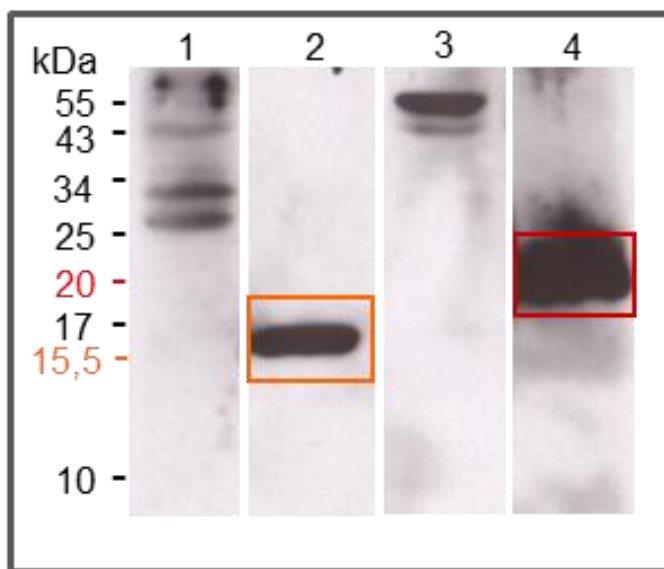


Abb. 3.21: Western Blot-Analyse von FGF1 und FGF18

FGF1- [1] und FGF18-Proteinexpression [3] in Lungenlysaten der Maus. Zur Kontrolle wurden das rekombinante FGF1 (450 ng pro Spur) [2] und FGF18 (50 ng pro Spur) [4] aufgetragen. Die rekombinanten Proteine zeigten die entsprechend des Herstellers angegebene Höhe von 15,5 kDa und 20 kDa. In der zu erwartenden Produktgröße von FGF1 (17 kDa) und FGF18 (20 kDa) konnte im Lungenlysat keine spezifische Bande detektiert werden. Es zeigt sich in beiden Fällen [1 und 3] ein unspezifisches Bandenmuster. 15%iges SDS-Gel, 20 µg Gesamtprotein pro Spur, Konzentration des Primärantikörpers gegen FGF1: 3,3 µg/ml, und gegen FGF18 : 2,8 µg/ml.

Der Proteinnachweis von FGF2 im Lungenlysat der Maus erfolgte über die Immundetektion mit Hilfe eines polyklonalen Anti-FGF2-Antikörpers im 15%igen SDS-Gel. Die Funktionalität des Antikörpers wurde zunächst an einem Lysat des Mausgehirns und einer Verdünnungsreihe des rekombinanten FGF2 getestet.

In der Literatur wurden alternative Startkodons für die FGF2-Synthese beschrieben, aus der durch N-terminale Verlängerung der Aminosäurekette FGF2-Isoformen mit

unterschiedlichen molekularen Gewichten resultieren. So sind für die Maus drei verschiedene Isoformen von jeweils 18, 21,5 und 22 kDa bekannt (Florkiewicz et al. 1991; Brigstock et al. 1990). Im Lysat des Mausgehirns zeigte sich ein Muster aus Banden verschiedener molekularer Masse, die den entsprechenden Isoformen zugewiesen werden konnte. Das rekombinante Protein wurde auf der nach Angaben des Herstellers zu erwarteten Höhe von 16 kDa detektiert (Abb. 3.22 A).

Um zu überprüfen, ob die Bindung des Antikörpers spezifisch an das FGF2-Protein erfolgte, wurde eine Präabsorptionskontrolle durchgeführt. Dabei wurde der Primäantikörper zunächst mit einem Überschuss eines synthetischen FGF2-Peptids inkubiert. Antikörper, die an das Peptid gebunden waren, konnten nun nicht mehr an das Epitop des gesuchten Proteins auf der PVDF-Membran binden. Spezifische Banden blieben auf diese Weise unmarkiert. Durch die Präabsorption mit dem rekombinanten Protein wurde der Antikörper komplett geblockt. Auch die Banden des Gehirnllysats zeigten lediglich ein schwaches Restsignal, welches sich bei ansteigender Konzentration des Peptids zunehmend reduzierte (Abb. 3.22 B und C). Dieses Experiment demonstriert, dass der verwendete Anti-FGF2-Antikörper dazu in der Lage ist, das gesuchte Zielprotein FGF2 zu detektieren.

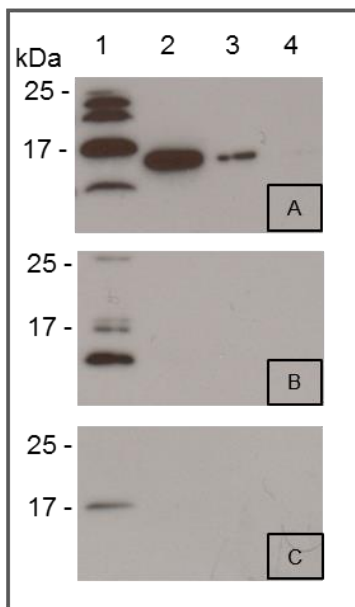


Abb. 3.22: Präabsorptionskontrolle für den Anti-FGF2-Antikörper im Western Blot

Die Geltaschen wurden mit einem Lysat aus Mausgehirn [1] und mit jeweils 100 ng [2], 50 ng [3], und 25 ng [4] eines rekombinanten FGF2 beladen. Die Membran A wurde mit dem reinen Anti-FGF2-Antikörper (2 µg/ml) inkubiert. Im Gehirnllysate konnten die 18, 21,5 und 22 kDa Isoformen detektiert werden. Das rekombinante FGF2 zeigt sich auf der erwarteten Höhe von ca. 16 kDa.

Die Membran B wurde mit dem Anti-FGF2-Antikörper (2 µg/ml) + der 10× Menge des FGF2-Peptids (20 µg/ml), die Membran C mit dem Anti-FGF2-Antikörper (2 µg/ml) + der 20× Menge des FGF2-Peptids (40 µg/ml) inkubiert. Die Banden des rekombinanten Proteins waren nach Präabsorption mit dem Peptid nicht mehr nachweisbar. Auch das Bandenmuster des Gehirnllysats zeigte lediglich ein minimales Restsignal.

Im Anschluss sollte die Proteinexpression von FGF2 in der Mauselunge der OVA- und PBS-Gruppe untersucht und miteinander verglichen werden. In jedem Versuchsdurchlauf wurden als Positivkontrollen ein Lysat aus Mausgehirn sowie das rekombinante FGF2 in absteigender Menge (100 ng, 50 ng, 25 ng und 12,5 ng) parallel mitgeführt. Zwanzig µg

des Proteins aus den Gewebelysaten wurde pro Spur eingesetzt. Der Erfolg des Proteintransfers wurde durch Schwenken der Membranen in Ponceau S-Färbung überprüft, bevor die Immundetektion erfolgte (Abb. 3.23).

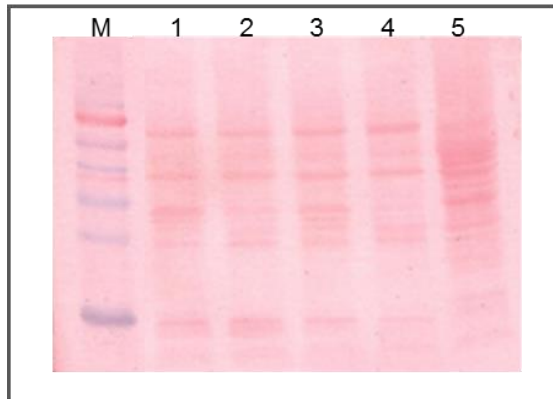


Abb. 3.23: PVDF-Membran gefärbt mit Ponceau S zur Überprüfung des Proteintransfers nach dem Western Blot
M= Marker, 1-4: Lungenlysat, 5: Gehirnllysat

Insgesamt wurden 8 OVA- und 8 PBS-behandelte Tiere auf die Proteinexpression der FGF2-Isoformen untersucht. Dabei konnte in allen untersuchten Tieren beider Versuchsgruppen die Präsenz der 18, 21,5 und 22 kDa Isoformen nachgewiesen werden (Abb. 3.24).

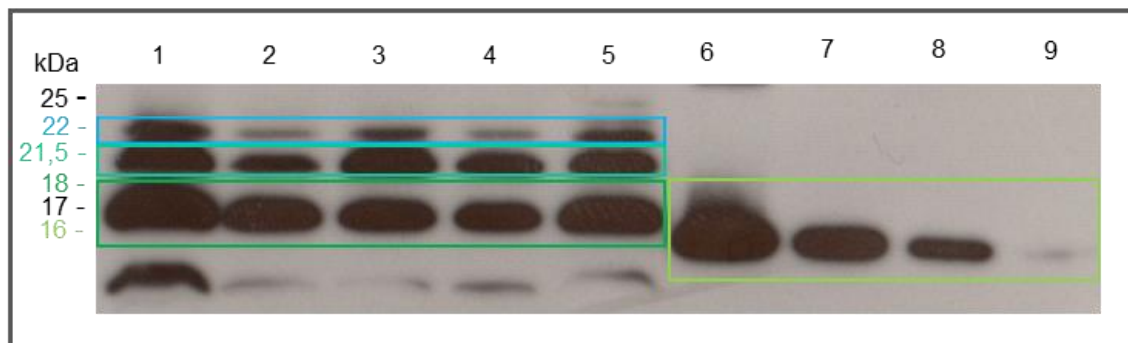


Abb. 3.24: Western Blot-Analyse von FGF2 in Lungen der Maus nach OVA- und PBS-Aerosolprovokation

Repräsentative Darstellung der FGF2-Proteinexpression in Lungenlysaten der OVA-Gruppe [1], [3] sowie der PBS-Kontrollgruppe [2], [4]. Als Positivkontrolle wurde Gehirnllysat aus der Maus [5] eingesetzt und eine Verdünnungsreihe (100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng) des rekombinanten FGF2 aufgetragen [6-9]. In den Proteinlysaten konnte die 18 kDa, 21,5 kDa und 22 kDa-Isoform des FGF2 detektiert werden. Das rekombinante Protein zeigte sich auf der erwartete Bandengröße von 16,43 kDa. 15%iges SDS-Gel, 20 µg Gesamtprotein pro Spur, Konzentration des Primärantikörpers: 2 µg/ml.

Um mengenmäßige Unterschiede zwischen dem FGF2-Proteinlevel der OVA- und PBS-Gruppe zu ermitteln, wurde anhand des Programms ImageJ eine Quantifizierung vorgenommen. Dieses Programm nimmt eine Densitometrie vor, indem es die Pixeldichte pro Flächeneinheit der immundetektierten Proteinbanden bestimmt. Pro Bandensignal erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung der Pixeldichte, aus denen der Mittelwert

errechnet wurde. Als Referenz wurde zunächst die Verdünnungsreihe des rekombinanten FGF2 gemessen. Die ermittelte Pixeldichte konnte den bekannten, eingesetzten Proteinmengen von 100, 50, 25 und 12,5 ng zugeordnet werden und auf diesem Wege eine Funktion erstellt werden. Im Folgenden wurden die Bandensignale der Lungenlysate aus jeweils 8 OVA- und 8 PBS-Tieren gemessen. Jede Isoform wurde einzeln bestimmt. Die Werte wurden in die Funktion eingegeben und auf diesem Weg die potenzielle Proteinmenge der entsprechenden Isoform in 20 µg Proteingesamtgemisch errechnet. Im Rahmen der Untersuchung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Proteinexpressionslevel der FGF2-Isoformen zwischen Tieren mit und ohne Atemwegsinfektion. Tendenziell ist jedoch bei allen Isoformen eine leichte Zunahme der Proteinmenge in den Lungenlysaten der OVA-Gruppe zu erkennen (Tab. 3.5, Abb. 3.25).

	OVA	PBS
FGF2 18 kDa	48,21 ± 9,28 ng (n.s.)	44,69 ± 14,6 ng
FGF2 21,5 kDa	56,37 ± 20,38 ng (n.s.)	39,77 ± 16,22 ng
FGF2 22kDa	28,53 ± 7,98 ng (n.s.)	25,15 ± 10,68 ng

Tab. 3.5: Densitometrische Quantifizierung der FGF2-Isoformen im Western Blot mit ImageJ
 Tabellarische Zusammenfassung der errechneten Proteinmengen der FGF2-Isoformen in Lungenlysaten aus der Maus nach Quantifizierung des Bandensignals mittels ImageJ. n = 8/Gruppe, n.s. = nicht signifikant, U-Test. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf einen Vergleich mit der PBS-Kontrolle.

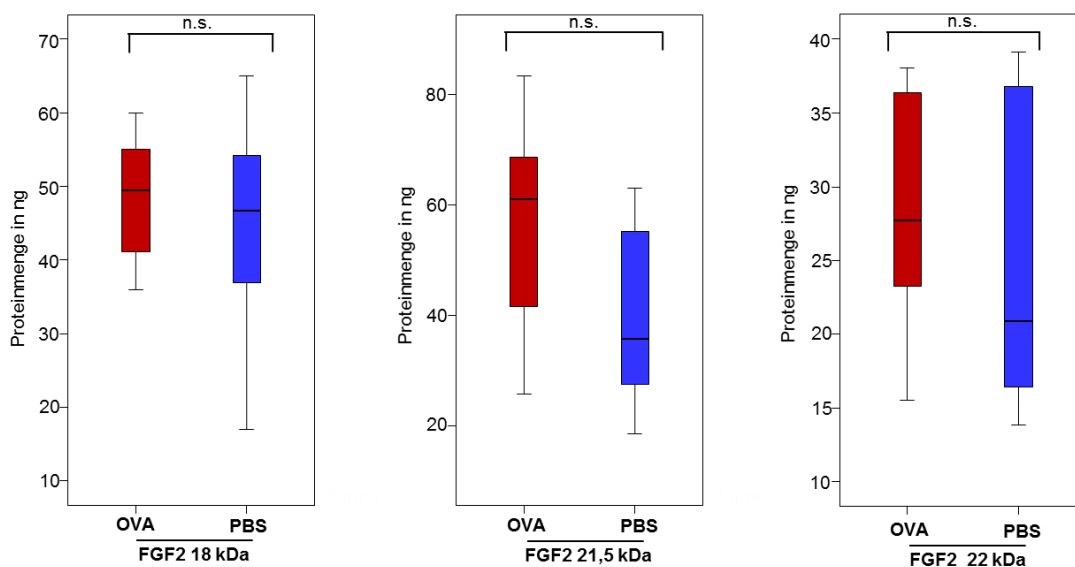


Abb. 3.25: Densitometrische Quantifizierung der FGF2-Isoformen im Western Blot mit ImageJ
 Im Lungenlysat der Maus zeigte sich zwischen der OVA- und der PBS-Gruppe kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge der exprimierten FGF2-Isoformen. n = 8/Gruppe, n.s. = nicht signifikant, U-Test.

3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von FGF2 in der Mauslunge mit und ohne allergische Atemwegsentzündung

Anhand von Aceton-fixierten Kryostatschnitten des Lungengewebes der Maus sollte die FGF2-Expression ergänzend in der Immunhistochemie nachgewiesen und histologisch lokalisiert werden. Außerdem sollten Unterschiede zwischen der OVA- und PBS-Gruppe untersucht werden. Eine FGF2-Expression war immunfluoreszenzmikroskopisch in beiden Versuchsgruppen im respiratorischen Epithel zu erkennen. Die Blutgefäße und die Alveolen zeigen in der PBS-Gruppe keine Fluoreszenzintensität. Eine leichte Reaktion des interstitiellen Lungengewebes war in der OVA-Gruppe anzunehmen. In den Präabsorptionskontrollen war eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzantwort im respiratorischen Epithel zu verzeichnen. Auch die Kontrolle der Sekundärreagenzien durch Weglassen des Primärantikörpers zeigte kein Signal (Abb. 3.26).

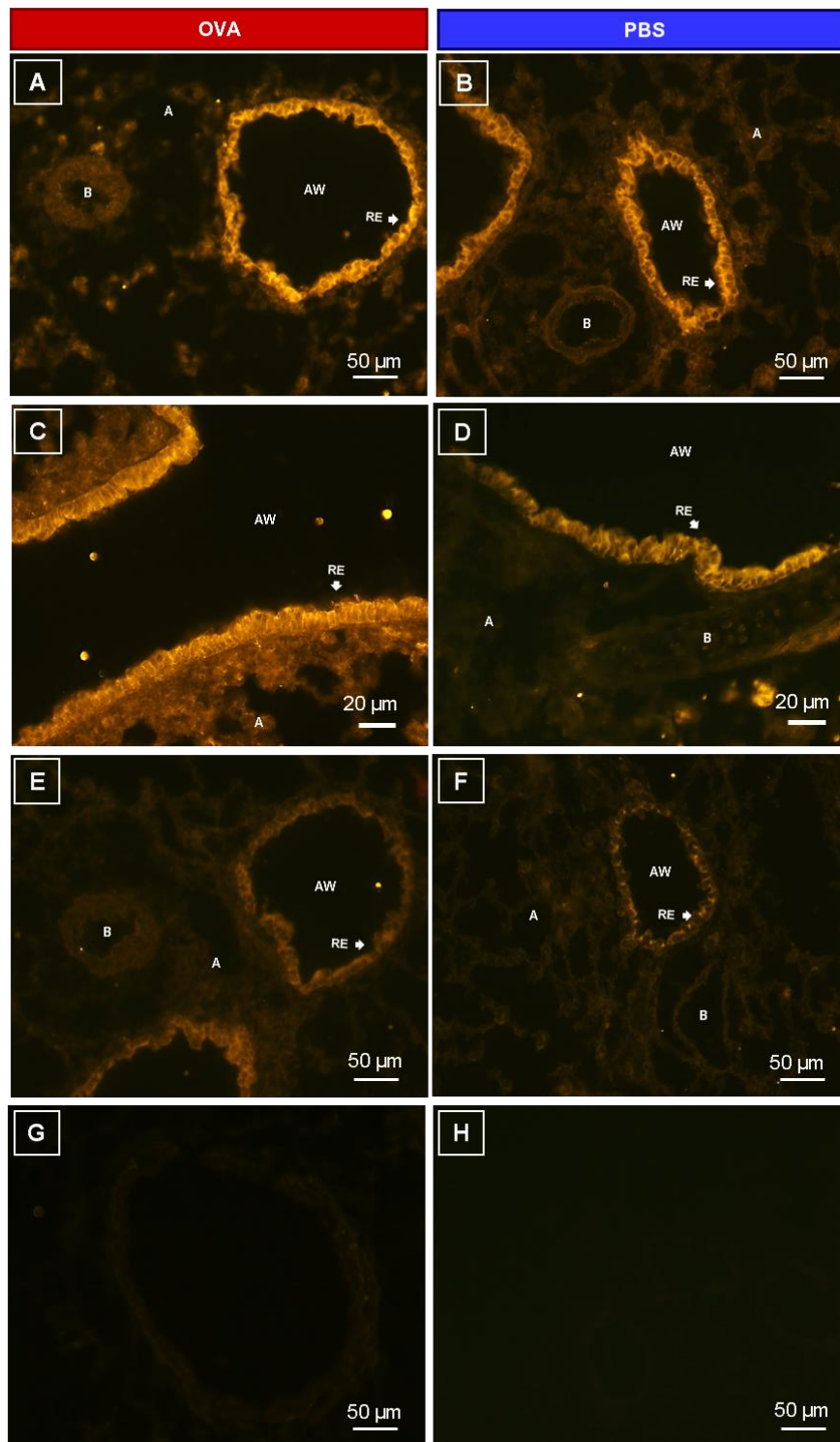


Abb. 3.26: FGF2-Immunfluoreszenz in der Mauslunge nach OVA- und PBS-Aerosolprovokation
 Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von FGF2 in der Mauslunge nach OVA-Aerosolprovokation [A, C] und nach PBS-Aerosolprovokation [B, D]. [E, F] zeigen eine Präabsorptionskontrolle nach vorausgegangener Inkubation des Primärantikörpers mit der vierfachen Menge des rekombinanten Proteins. [G, H] stellen die Kontrolle der Sekundärreagenzien nach Weglassen des Primärantikörpers dar. A = Alveolarregion, AW = Atemwege, B = Blutgefäße, RE = Respiratorisches Epithel.

3.4 Funktioneller Einfluss der FGFs auf sensorische Neurone des JNG

3.4.1 Auswachsassay

Bei der allergischen Atemwegsinfektion ist eine Hyperinnervation der Atemwege mit sensorischen Neuronen nachzuweisen, die auf ein vermehrtes Nervenfasernwachstum und eine Zunahme der Nervenfaserverzweigung zurückzuführen ist (Goldie et al. 2001). Deswegen sollte der Effekt der FGFs auf das Auswachsen von Nervenfortsätzen analysiert werden. Die Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit auf die beiden Prototypen FGF1 und FGF2 beschränkt. Sie erfolgten an Neuronen des dissoziierten JNG. Da sich im JNG neben den C-Faser-Neuronen auch die Perikarien von A-Faser-Neuronen befinden und die viszerosensiblen Afferenzen des Nervus vagus in ihrer Gesamtheit nicht nur die Lunge, sondern auch andere Organe sensorisch innervieren, können die im Rahmen dieser Versuchsreihe ermittelten Ergebnisse nicht ausschließlich auf bronchopulmonale C-Fasern bezogen werden. Die sensorischen Neurone der vagalen Ganglien wurden für 24 Stunden mit rekombinanten FGFs kultiviert. Als Negativkontrolle (NK) wurden Neurone mit L-15 Medium ohne Zusatz inkubiert; als Positivkontrolle wurde der *Nerve Growth Factor* (NGF) eingesetzt, dessen Potenz auf das Nervenfasernwachstum in Zellkulturen bereits belegt wurde (Levi-Montalcini 1987). Unter dem Fluoreszenzlicht wurde das neuronale Auswachsen anhand der Dendritenlänge mit Hilfe der Software IMARIS bestimmt. Insgesamt wurden dabei 186 Neurone der NGF-Positivkontrolle, 78 Neurone der Negativkontrolle, 56 mit FGF1 kultivierte Neurone und 77 mit FGF2 kultivierte Neurone analysiert. Es wurden nur PGP 9.5-positive Zellen (pan-neuronaler Marker) in die Analyse eingeschlossen. In der Datenauswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Dendritenlänge zwischen der Negativkontrolle und der mit NGF kultivierten Neurone. ($340 \times 10^3 \pm 26 \times 10^3$ (NK) vs. $580 \times 10^3 \pm 27 \times 10^3$ (NGF), $p \leq 0,05$, U-Test). Auch sensorische Neurone, die mit FGF1 kultiviert wurden, zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der Dendritenlänge ($340 \times 10^3 \pm 26 \times 10^3$ (NK) vs. $513 \times 10^3 \pm 51 \times 10^3$ (FGF1), $p \leq 0,05$, U-Test). FGF2 scheint tendenziell auch einen wachstumsfördernden Effekt auf Dendriten auszuüben, im unmittelbaren Vergleich zur Negativkontrolle ist der Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant ($340 \times 10^3 \pm 26 \times 10^3$ (NK) vs. $452 \times 10^3 \pm 46 \times 10^3$ (FGF2), n.s., U-Test) (Abb. 3.27). Die Abb. 3.28 stellt exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der sensorischen Neurone nach 24-stündiger Kultur mit den entsprechenden Medien dar (Abb. 3.28).

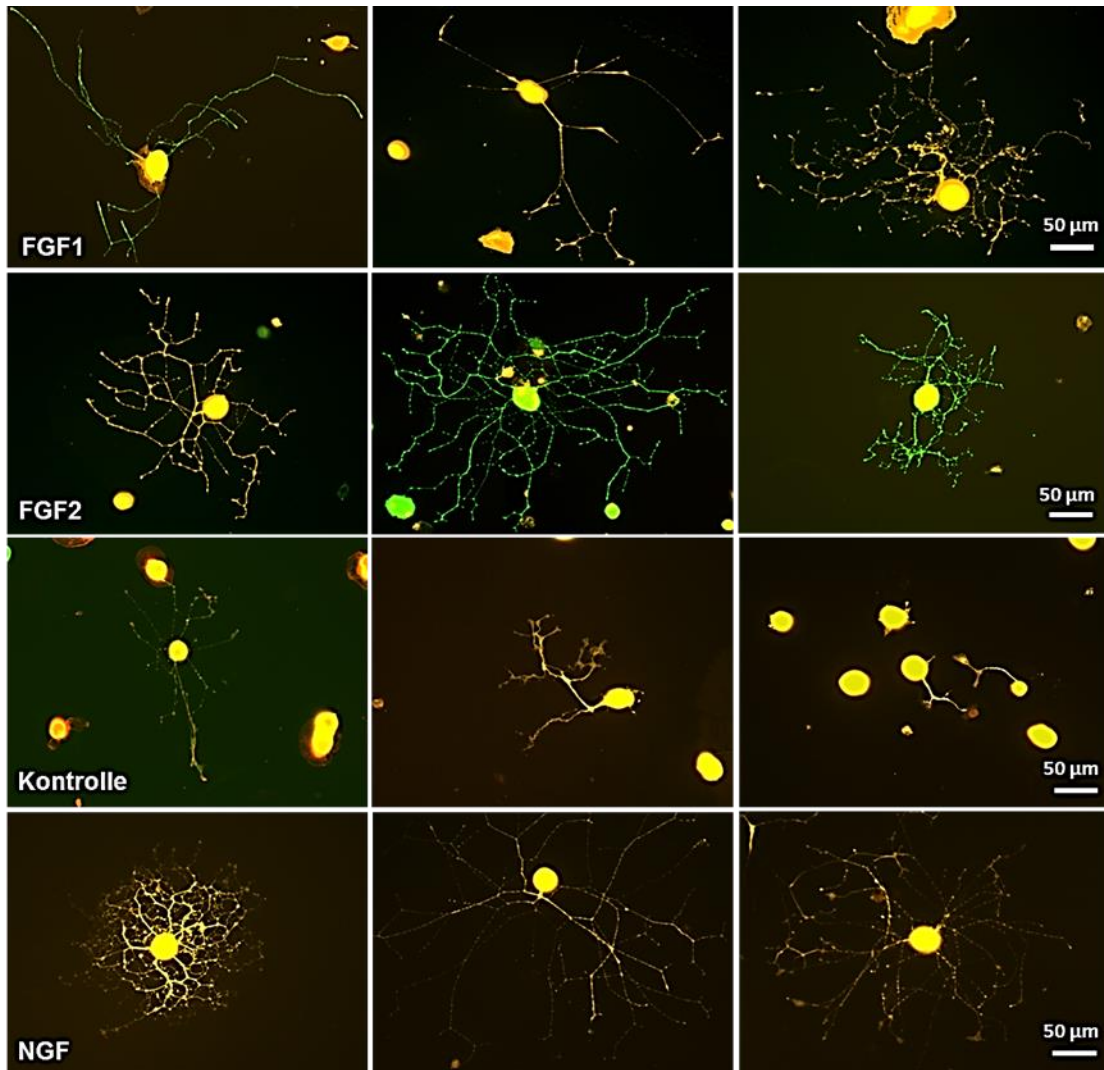


Abb. 3.28: Auswachsassay von dissoziierten JNG nach Stimulation mit FGFs
 Dargestellt sind immunhistochemisch markierte PGP 9.5-positive Neurone des dissoziierten JNG nach 24-stündiger Inkubation mit L-15 Medium + FGF1 (50 ng/ml), L-15 Medium + FGF2 (50 ng/ml), L-15 Medium ohne Zusatz als Negativkontrolle und L-15 Medium + NGF (50 ng/ml) als Positivkontrolle.

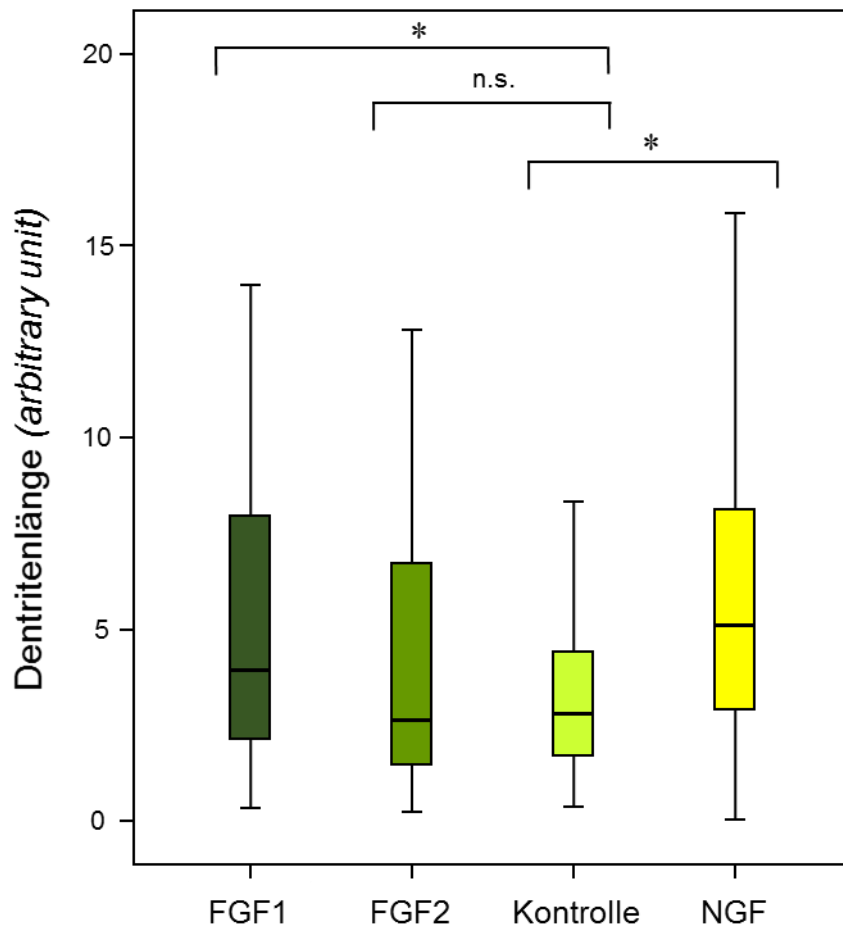


Abb.3.27 Quantitative Analyse des Auswachsassay von dissoziierten JNG nach Stimulation mit FGFs

Mit dem Software Programm IMARIS wurden die Dendritenlänge von Neuronen nach 24-stündiger Kultivierung mit FGF1, 2 und NGF bestimmt. Als Kontrolle wurde L-15 Medium verwendet. n = 56 in FGF1-Gruppe, n = 77 in FGF2-Gruppe, n = 78 in der Negativkontrolle, n = 186 in Positivkontrolle, *p ≤ 0,05, n.s. = nicht signifikant, U-Test.

4. Diskussion

In den vergangenen Jahren wurde zunehmend eine Fehlregulation sensorischer Atemwegsneurone in der Pathogenese der AHR beim allergischen Asthma bronchiale diskutiert. Die Mediatoren, die für die Entstehung der Hyperreagibilität verantwortlich sind, sind bis dato nicht abschließend geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob FGFs eine Familie an Mediatoren darstellen, welche mit sensorischen Neuronen der Lunge in Interaktion treten können. Letzteres vorausgesetzt, gilt es zu klären, ob und inwiefern diese Interaktion infolge einer allergischen Atemwegsinfektion pathologisch verändert wird, ferner über diesen Mechanismus Beitrag an der Entstehung der AHR genommen wird. Grund zur Annahme lieferte dabei zum einen die enge räumliche Lagebeziehung der sensorischen Nervenendigungen zur Lamina reticularis der Basalmembran (Watanabe et al. 2005), in der verschiedene Vertreter der FGFs extrazellulär an Proteoglykane gebunden werden (Aviezer et al. 1994), sowie diverse Vorstudien, welche erhöhte FGF2-Spiegel im Sputum bzw. der BAL erkrankter Patienten im Zusammenhang mit der Pathogenese des allergischen Asthmas bronchiale brachten (Redington et al. 2001; Bissonnette et al. 2014).

Anhand der durchgeführten Experimente wurden zusammenfassend folgende Ergebnisse ermittelt: Bronchopulmonale C-Faser-Neurone des Ggl. nodosum sind dazu in der Lage, die mRNA des FGFR1 zu exprimieren, wobei der prozentuale Anteil der FGFR1 exprimierenden Zellen von Tieren mit und ohne Atemwegsinfektion nahezu identisch war. Außerdem konnte die FGFR1 IIIc-Variante als vorwiegende Spleißvariante bei Mäusen beider untersuchten Versuchsgruppen identifiziert werden. In der Lunge ließ sich mRNA für verschiedene Liganden der IIIc-Variante nachweisen, wobei die Ergebnisse darauf hinweisen, dass die mRNA-Expression von FGFs entzündungsabhängig reguliert wird. Auf Proteinebene konnten im Western Blot alle FGF2-Isoformen in Lungenlysaten von Mäusen mit und ohne Atemwegsinfektion detektiert werden, jedoch zeigten sich keine signifikanten entzündungsabhängigen Unterschiede im Proteinexpressionslevel. Immunhistochemisch wurde FGF2 in beiden Versuchsgruppen im Bronchialepithel lokalisiert. In dem Auswachsassay kann ein signifikanter wachstumsfördernder Effekt von FGF1 auf die Dendriten sensorischer Neurone des JNG festgestellt werden.

An dieser Stelle der Arbeit sollen die gewonnen Erkenntnisse in den Kontext des gegenwärtigen Wissenstandes eingeordnet werden.

4.1 Etablierung eines Mausmodells für die akute allergische Entzündung der Atemwege

In der vorliegenden Studie diente die OVA-immunisierte Maus mit nachfolgender OVA-Aerosol-Provokation als Modell der entzündlichen Atemwegsveränderungen, wie sie auch beim Menschen für das allergische Asthma typisch sind. Das angewendete akute Modell wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in unserem Labor etabliert. Der Nachweis über die erfolgreiche Provokation einer akuten Entzündungsreaktion sowie dessen Abgrenzung zu einer chronischen Entzündung erfolgte anhand von Analysen der BAL und histologischen Schnittpräparaten. Ein Augenmerk wurde dabei unter anderem auf das entzündliche Infiltrat gelegt, wie es auch in der Lunge von Patienten mit allergischen Asthma nachweisbar ist. Ca. 6-9 Stunden nach dem Antigenkontakt tritt bei ca. der Hälfte der Asthmatiker ein erneuter Abfall der Einsekundenkapazität (FEV_1), dem absoluten forcierten expirierten Volumen der ersten Sekunde, ein, was auch als Spätphasereaktion bezeichnet wird (O'Byrne et al. 1987). Während bei der Frühphasereaktion eher Mediatoren von gewebständigen Mastzellen von Bedeutung zu sein scheinen, ist die Spätphasereaktion auf zellulärer Ebene eher durch ein Entzündungsinfiltrat gekennzeichnet, das vor allem von Eosinophilen dominiert wird. Infolge zahlreicher chemotaktisch wirkender Mediatoren kommt es zum Einwandern von im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten in das interstitielle Lungengewebe und die Bronchiallumina. Diese schädigen am Ort der Entzündung das Gewebe und halten die Entzündungsreaktion aufrecht (Buhl et al. 2011). Unter anderem rekrutieren und aktivieren IL-5 und das Chemokin CCL11 (Eotaxin) Eosinophile, IL-4 lockt Mastzellen an, IL-6 vermittelt B-Zelldifferenzierung, Leukotriene wirken unterstützend auf die Chemotaxis Neutrophiler und $TNF-\alpha$ steigert die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen, um auf diesem Wege die Diapedese zu unterstützen (Joo und Kau 2013). Um im Rahmen unserer Experimente das Einwandern der Entzündungszellen beobachten zu können, erfolgte die Tötung der Tiere im Asthmaprotokoll mit einer zeitlichen Latenz von 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation. In unseren Studien spiegelte sich der Influx entzündlicher Zellen u.a. in einer mehr als sechsfach gesteigerten BAL-Gesamtzellzahl in der OVA-Gruppe wider. Das Vorliegen einer Eosinophilie als Charakteristikum der akuten allergischen Atemwegsinfektion konnte in differenzialzytologischen Untersuchungen in der BAL der OVA-Gruppe bestätigt werden. Auch die Anzahl der Neutrophilen und Lymphozyten war signifikant

erhöht. Bei Letzteren kann angenommen werden, dass es sich insbesondere um aktivierte CD4⁺-T_H-Zellen vom Subtyp 2 handelt, welche mit ihrem Zytokinmuster maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung der Allergie beteiligt sind (Buhl et al. 2011). Als histopathologisches Korrelat zeigte sich in den H.E.-gefärbten Schnittpräparaten der Lunge ein deutliches peribronchiales und insbesondere perivaskuläres entzündliches Infiltrat, das in der PBS-Kontrollgruppe fehlte. Abgesehen von einem chemotaktisch gesteuerten Einstrom der Entzündungszellen aus dem Blut, lässt sich auch ein verlängertes Überleben der Zellen im Rahmen der allergischen Atemwegsinfektion diskutieren (Nassenstein et al. 2003). In diesem Zusammenhang ist eine Studie zu erwähnen, die aufzeigt, dass auch FGFs dazu in der Lage sind, die Lebensspanne von Eosinophilen zu verlängern. Im Plasma und in Ösophagealproben an eosinophiler Ösophagitis erkrankter Patienten konnten erhöhte FGF2-Spiegel nachgewiesen werden, welche wiederum mit einer Aktivierung antiapoptotischer Signalwege und folglich einem verlängertem Überleben der Eosinophilen assoziiert waren (Huang et al. 2010). Die eosinophile Ösophagitis ist eine immunvermittelte, chronisch-entzündliche Erkrankung des Ösophagus, welche dem Formenkreis der atopischen Erkrankungen zugerechnet werden kann (Chehade und Sampson 2008). Daher könnte ein ähnlicher Effekt möglicherweise auf die Eosinophilie im allergischen Asthma übertragen werden.

Neben dem Entzündungsinfiltrat kommt es im zeitlichen Verlauf der Atemwegsinfektion im Lungengewebe zu weiteren strukturellen Veränderungen, die sich histopathologisch detektieren lassen. In der PAS-Färbung waren schleimproduzierende Zellen im Epithel der Bronchioli der OVA-Tiere nachweisbar. Intraepithelial gelegene einzellige Drüsen werden beim Menschen als Becherzellen bezeichnet, während die unter physiologischen Bedingungen vorkommenden vergleichbaren Zelltypen in kleinen Säugetieren wie der Maus aufgrund von ultrastrukturellen Unterschieden als Mukus-Zellen zusammengefasst werden (Pavelka et al. 1976; Plopper et al. 1980; Kummer et al. 2008). In den kleinen Atemwegen des Menschen und in allen intrapulmonalen Bronchien und Bronchiolen der Maus sind physiologisch so gut wie keine schleimproduzierenden Zellen vorzufinden. In der Maus besteht das Atemwegsepithel beispielsweise zu ca. 40% aus zilientragenden Zellen und zu ca. 60 % aus nicht zilientragenden Zellen, bei denen es sich in der Regel um Keulenzellen handelt (Hayashi 2012; Vermeer et al. 2003). Keulenzellen sind sekretorisch aktive Zellen der distalen Atemwege, die Proteine im Dienste der unspezifischen Abwehr sezernieren (Lüllmann-Rauch 2006). Im entzündeten

respiratorischen Epithel kommt es sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zu einer Metaplasie und Hyperplasie von Becherzellen (Elias 2000; Blyth et al. 1996). Eine Metaplasie impliziert den Wechsel des Zellphänotyps infolge einer zellulären Anpassung auf die Umgebung. Im Rahmen einer allergischen Atemwegsinfektion kann ein solcher Wechsel beispielsweise aus den Keulenzellen oder den ziliert tragenden Zellen erfolgen (Hayashi 2012; Brody et al. 1987; Burgel und Nadel 2004). Hingegen beschreibt die Hyperplasie einen Mechanismus, der durch eine übermäßige Zellbildung zu einem Anstieg in der Becherzellanzahl führt. Sie resultiert aus der Differenzierung proliferierender Progenitorzellen (Hayashi 2012). Das Vorliegen der Meta- und Hyperplasie von Becherzellen im Sinne eines beginnenden strukturellen, irreversiblen Umbaus der Lunge bei der akuten allergischen Atemwegsinfektion wurde bereits 2004 von McMillan et al. belegt (McMillan und Lloyd 2004).

Die Verdickung der retikulären Basalmembran infolge einer Deposition von Kollagen Typ I, III und V ist ebenso als strukturelles Merkmal des *Airway Remodeling* aufzuführen (Roche et al. 1989). Eine subepitheliale Fibrose war in unseren histologischen Untersuchungen noch nicht nachweisbar. Das angewendete Mausmodell der akuten allergischen Atemwegsinfektion verlief über fünf Wochen und umfasste drei Allergenprovokationen. Studien, welche ein chronisches Modell repräsentieren sollen, zeigen, dass nach mehrwöchiger repetitiver Allergenprovokation ein deutlicher Umbau der Atemwege mit gesteigerter subepithelialer, aber auch perivaskulärer Matrixdeposition vorhanden ist (McMillan und Lloyd 2004). Um das angewendete akute Modell als solches zu charakterisieren, wurde die Masson-Goldner-Färbung an den Paraffinschnitten der Lunge durchgeführt. Sie färbt Kollagen grün, sodass sich damit eine vermehrte Anhäufung extrazellulärer Matrix qualitativ nachweisen lässt. In den histologischen Schnittpräparaten zeigte sich wie erwartet kein quantitativer Unterschied in der Kollagendisposition zwischen der OVA- und PBS-Gruppe.

Zwar konnten wir in der vorliegenden Arbeit aufgrund fehlender technischer Ausstattung keine zusätzlichen atemphysiologischen Untersuchungen zum direktem Nachweis der AHR durchführen, jedoch zeigen Studien, die sich einem vergleichbaren Mausmodell bedienen, dass lungenfunktionelle Parameter bereits nach akuter Allergenprovokation, wie sie auch im vorliegenden Fall erfolgte, im Sinne einer AHR verändert sind (Nassenstein et al. 2006b; McMillan und Lloyd 2004). Verschiedene Methoden können zu diesem Zweck eingesetzt werden. Ein mögliches Verfahren, welches am wachen, nicht narkotisierten Tier angewendet wird, stellt die Head-out-Bodyplethysmographie dar.

Anhand dessen kann zum einen die EF50, der expiratorische Flow bei 50 % des Ausatemvolumens, nach Methacholinprovokation als Ausdruck einer Bronchokonstriktion bestimmt werden. Zudem kann nach Inhalation C-Faser-Neuron-spezifischer Agonisten wie Capsaicin die sog. *Time of Break* ermittelt werden. Dabei handelt es sich um die Länge der Pause vor der Expiration, die bei vorliegender AHR verlängert ist, und daher als Maß für die Reagibilität sensibler Neurone in der Maus etabliert wurde (Vijayaraghavan et al. 1994; Alarie 1998). Im Vergleich zu gesunden Mäusen reagieren Mäuse mit Atemwegsentzündung bereits bei geringeren Konzentrationen des Aerosols mit einem Anstieg der *Time of Break* und einem Abfall des EF50. Ein weiterer Parameter ist die pulmonale Resistance, welche den Strömungswiderstand in den Luftwegen bei der Atmung repräsentiert. Deren Bestimmung erfolgt an der narkotisierten, intubierten Maus, was somit eine invasive Verfahren zum Monitoring der Lungenfunktion darstellt (Glaab et al. 2007). Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in den Lungen der mit OVA behandelten Mäuse eine Atemwegsinflammation nachweisbar ist, welche der akuten Phase der Entzündung entspricht, und somit bestätigt, dass das angewendete Modell funktioniert.

4.2 FGFR-Expression in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum

In der vorliegenden Studie wurde erstmalig die FGFR1-4 mRNA-Expression in bronchopulmonalen, plakodalen C-Faser-Neuronen aus dem JNG-Komplex auf Einzelzellebene untersucht. Bei verschiedenen Spezies, wie dem Meerschweinchen, sind die beiden Ganglien, das Ggl. nodosum und das Ggl. jugulare, voneinander getrennt, während bei der Maus nur ein einzelnes Ganglion nachgewiesen werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Fusion beider Anteile handelt, wobei dessen unterschiedliche embryonale Herkunft zu berücksichtigen ist. Die C-Fasern aus dem Ggl. nodosum entstammen der Ohrplakode und machen ca. 90% der C-Faser-Neurone des gesamten JNG-Komplexes aus. Demgegenüber stehen die C-Faser-Neurone des Ggl. jugulare, welche embryologisch wie die Spinalganglien aus der Neuralleiste stammen und einen Anteil von 10% an allen C-Faser-Neuronen des JNG haben (Nassenstein et al. 2010). Periphere Atemwege werden eher von Neuronen des Ggl. nodosum innerviert, große Atemwege bevorzugt von denen des Ggl. jugulare. Da Asthma bronchiale

bevorzugt eine Erkrankung der kleinen Atemwege ist, haben wir in dieser Studie nur Neurone des Ggl. nodosum untersucht. Wir konnten in unseren Daten zeigen, dass der FGFR1 sowohl in der OVA- als auch der PBS-Gruppe überwiegend exprimiert wird, während die anderen FGFR2-4 in diesem Zelltyp keine Rolle zu spielen scheinen. Dies gibt Grund zur Annahme, dass der FGFR1 in sensorischen C-Fasern-Neuronen eine funktionelle Rolle spielen könnte. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich der prozentuale Anteil FGFR1-exprimierender Zellen in der OVA- und PBS-Gruppe nicht unterscheidet. Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersuchten Oellig et al. bereits 1995 das Expressionsprofil der FGFR1-4 in Spinalganglien der adulten Ratte (Oellig et al. 1995). Bei den Spinalganglien handelt es sich ähnlich der JNG um sensorische Ganglien, die pseudounipolaren Nervenzellkörper sensorischer Neurone enthalten. Anhand spezifischer DNA-Sonden konnte Oellig et al. den FGFR1 und 2 *in situ* in jeweils ca. 20 % der DRG-Neurone detektieren, während FGFR3 und 4 nicht nachweisbar waren. Die von Oellig et al. gewonnenen Ergebnisse stützen unsere Theorie, dass sensorische Neurone FGFR exprimieren können, jedoch unterscheidet die Studie nicht zwischen den verschiedenen Klassen sensorischer Neurone sowie dem Innervationsgebiet. Zudem handelt es sich um Gewebe unterschiedlichsten embryonalen Ursprungs. Die Spinalganglien entstammen der Neuralleiste, während das von uns untersuchte Ggl. nodosum aus der Plakode hervorgeht.

Wie bereits beschrieben, konnten in unserer Studie keine direkten Unterschiede im prozentualen Anteil FGFR1-exprimierender Zellen zwischen OVA- und PBS-behandelten Tieren detektiert werden. An dieser Stelle kann jedoch noch nicht ausgeschlossen werden, dass quantitative Unterschiede im mRNA-Gehalt der FGFR1 positiv getesteten Zellen der OVA- und PBS-Gruppe bestehen. Aufgrund dessen wurden Versuche unternommen, die Quantifizierung des mRNA-Gehalt auf Einzelzellebene zu etablieren. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass sich die *single-cell* PCR infolge der geringen Menge der eingesetzten cDNA generell an der Grenze der Nachweisbarkeit bewegt, sodass uns mit der qRT-PCR auf dieser Ebene bislang noch keine Erhebung valider Daten möglich war. In diesem Zusammenhang wurde für zukünftige Versuche über eine Prä-Amplifikation des Probenmaterials nachgedacht, um die Menge an auswertbarem Probenmaterial für weitere Untersuchungen zu vergrößern.

4.3 Expression der FGFR1-Varianten in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum

Wie einleitend erwähnt, wird die Struktur des FGFR1 durch alternatives Spleißen des Transkripts, u.a. durch Modifikation der immunglobulinähnlichen Domäne 3 funktionsrelevant variiert. Die Varianten treten gewebespezifisch auf, sodass eine Vielzahl von FGF/FGFR-Komplexen entstehen kann, die in ihrer räumlichen und zeitlichen Expression strikt reguliert werden (www.atlasgeneticsoncology.org). Deren intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne erscheint dabei weitestgehend homolog. Daraus resultiert, dass das potenzielle Spektrum der zu katalysierenden Signalwege untereinander sehr ähnlich ist (Johnson und Williams 1993). Zu den klassischen Signalkaskaden von FGFR1 gehören beispielsweise der *Mitogen-Activated Protein* (MAP)-Kinase-Signalweg, der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)/Akt-Signalweg sowie die Aktivierung der Phospholipase C (www.atlasgeneticsoncology.org). Der funktionelle Unterschied besteht hauptsächlich in der Bindungsaffinität der einzelnen Varianten zu den verschiedenen FGF-Liganden, welche wiederum gewebespezifisch exprimiert werden. Wir konnten mit Hilfe der *single-cell*-RT-PCR nachweisen, dass in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum ausschließlich die mRNA der FGFR1 IIIc-Variante exprimiert wird. Dabei wollten wir auch die Frage beantworten, ob sich das Expressionsmuster der Neurone infolge der OVA-Allergen-Provokation ändert. Ein solcher *Exon Switch* wurde beispielsweise in der Pathogenese des Prostatakarzinoms beschrieben. Dabei ist die Malignität von Prostataepithelzellen mit einem Wechsel von der Expression des Exons IIIb zur Expression des Exons IIIc im Gen des FGFR2 vergesellschaftet (Yan et al. 1993). In unserem Fall konnte eine OVA-Allergen-Provokation jedoch keinen *Exon Switch* herbeiführen. Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass die FGFR1 IIIc-Variante die vorherrschende Spleißvariante sowohl in gesunden als auch in Mäusen mit allergischer Atemwegsentzündung zu sein scheint. Expressionsanalysen in diversen Vorstudien des FGFR1 und seiner Spleißvarianten geben bereits Hinweise darauf, dass die FGFR1 IIIc-Variante nahezu ubiquitär im Organismus verbreitet ist, während die FGFR1 IIIb-Variante organspezifisch limitiert ist und insbesondere in der Dermis und Epidermis sowie im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Beer et al. 2000; Johnson und Williams 1993).

Auf die RT-PCR-Analysen aufbauend, wurde der Nachweis des Rezeptors auf Proteinebene angestrebt. Dafür wurden die Verfahren der Western Blot-Analyse und der

Immunhistochemie angewendet. Die gewonnenen Daten konnten jedoch aufgrund einer fehlenden Spezifität des verwendeten Anti-FGFR1-Antikörpers nicht als valide angesehen werden.

4.4 Expression von FGFs in der Mauslunge

Der Nachweis der FGFR1 IIIc-Variante in bronchopulmonalen C-Faser-Neuronen eröffnete uns nachfolgend die Möglichkeit, explizit nach seinen spezifischen Bindungspartnern in Lungen von Mäusen der OVA- und PBS-Gruppe zu suchen. Wie im Kapitel 3.3 bereits beschrieben, kommen 14 FGFs als potenzielle Bindungspartner für die FGFR1 IIIc-Variante in Frage. Einige konnten wir anhand von qualitativen RT-PCR-Analysen in der Mauslunge detektieren. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen untereinander zeigt sich, dass FGFs infolge der akuten allergischen Atemwegsinfektion in ihrer Expression reguliert werden. Die Mehrheit der untersuchten FGFR1IIIc-Bindungspartner wurden interessanterweise prozentual seltener in den Lungen der asthmatischen Mäuse nachgewiesen als in den gesunden Kontrollen. Darunter sind beispielsweise FGF5 und FGF8 zu erwähnen (wobei die Unterschiede für die FGF8 mRNA-Expression nicht signifikant eingestuft wurden). Für diese Zytokine gibt es bereits Hinweise darauf, dass deren Expression im Rahmen von inflammatorischen Prozessen des Respirationstraktes verändert wird. Eine Studie aus dem Jahre 2012 zeigt beispielsweise anhand von qRT-PCR-Analysen eine signifikante Hochregulation der FGF5- und FGF8-Expression im sinonasalen Gewebe der Maus, nachdem zuvor eine chronische allergische Rhinosinusitis in deren oberen Atemwegen induziert wurde (Sautter et al. 2012). Die allergische Rhinosinusitis wird wie das allergische Asthma bronchiale der Typ 1-Reaktion nach Coombs und Gell zugerechnet, bei der die wiederholende Allergenexposition zu einer Chronifizierung mit daraus resultierendem Gewebeumbau führt (Buhl et al. 2011). In den in der Studie begleitend durchgeführten histopathologischen Studien waren die typischen Veränderungen, welche infolge einer chronischen Entzündung im Respirationstrakt zu erwarten sind, beschrieben worden; darunter eine Hyper- und Dyskrinie sowie eine Metaplasie mit Verlust der zilientragenden Zellen (Sautter et al. 2012). Interessanterweise zeigte sich der Anstieg im mRNA-Gehalt von FGF5 und 8 erst nach dreimonatiger Allergenprovokation, während frühzeitige Messungen im Verlauf (nach 1 Woche, 3 Wochen und 2 Monaten) keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufwiesen. Dies

deutet darauf hin, dass die Expressionsstärke im zeitlichen Verlauf des Entzündungsgeschehens zu variieren scheint. Ob eine chronische Allergenprovokation das Expressionmuster auch in unserem Fall gegenteilig beeinflusst hätte, bleibt zu diesem Zeitpunkt unklar. Es muss berücksichtigt werden, dass unsere Daten für FGF5 und FGF8 rein qualitative Analysen sind, die den Anteil positiver Proben an der Gesamtheit aller getesteten Proben angeben, und keine Aussage über den mRNA-Gehalt in der einzelnen Probe liefern. Zusammenfassend lässt sich an diesem Punkt dennoch festhalten, dass die Expression von FGF5 und 8 infolge entzündlicher, allergischer Prozesse einer Dynamik zu unterliegen scheint, jedoch weitere Studien notwendig sind, um eine definitive Assoziation zwischen der FGF5- und FGF8-Expression und der allergischen Atemwegsinfektion aufzustellen bzw. ferner deren Bedeutung für diese Krankheitsbilder zu definieren.

Das derselben Subfamilie wie FGF8 entstammende und mit 53,7%iger Aminosäuregleichheit hoch homologe FGF17 zeigte sich in den RT-PCR-Analysen entzündungsabhängig herunterreguliert. Bislang wurde für dieses Zytokin in der gegenwärtigen Literatur jedoch nur wenig beschrieben. Die meisten Studien konzentrieren sich auf Untersuchungen, die einen Zusammenhang von FGF17 mit der Entwicklung oder Pathologie des Nervensystems untersuchen (Hoshikawa et al. 1998; Scarce-Levie et al. 2008; Zanni et al. 2011). Welche Bedeutung dem FGF17 in der Lunge zugeschrieben werden kann bzw. ob es in Bezug auf inflammatorische Prozesse eine Rolle spielt, bleibt bislang jedoch noch unklar.

Ähnlich verhält es sich mit FGF21. In der aktuellen Forschung wird FGF21 vor allem in Hinblick auf metabolischen Störungen und Pathologien der Leber untersucht (Spolcová et al. 2014; Liu et al. 2014). Welche Bedeutung FGF21 in Bezug auf pulmonale Erkrankungen, im Speziellen dem Asthma bronchiale, zugeschrieben werden, kann ist noch nicht bekannt.

FGF23 ist das einzige Zytokin der FGF-Familie, welches in einem höheren Anteil von Lungen aus Tieren mit Atemwegsinfektion exprimiert wurde als von Lungen der gesunden Kontrolle. In der Literatur liegt der Untersuchungsschwerpunkt auf dessen Einfluss auf den Phosphat- und Vitamin D-Metabolismus, an welchem FGF23 unmittelbar beteiligt ist (Shimada et al. 2004; Ghafouri-Fard et al. 2014; Wesseling-Perry et al. 2014). Auch in diesem Fall ist der Einfluss von FGF23 auf das allergische Asthma bronchiale oder andere chronisch inflammatorischen Erkrankungen noch unerforscht. FGF1, FGF2, FGF9, FGF16 und FGF18 wurden in der qualitativen RT-PCR konstitutiv

exprimiert und daher in der quantitativen RT-PCR weiter analysiert. Auch hier zeigte sich, dass im Falle von FGF1, FGF2 und FGF18 eine signifikante Reduktion des mRNA-Gehalts nach Allergenprovokation zu messen war. Nur für FGF9 konnte ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression von FGF16 zwischen den Lungen von Tieren beider Versuchsgruppen waren statistisch nicht signifikant. Insgesamt existieren zum aktuellen Zeitpunkt noch wenige Studien, die sich mit der Assoziation der FGF-Expression und der allergischen Atemwegsentzündung auseinandersetzen. Für FGF1 und FGF2 wurden von der bereits erwähnten Arbeitsgruppe um Sautter et al. qRT-PCR-Analysen durchgeführt, die teilweise Parallelen zu unseren gewonnenen Daten aufweisen. Zwar konnten für FGF1 keine signifikanten Unterschiede im mRNA-Gehalt zwischen Tieren mit und ohne akuter allergischer Rhinitis festgestellt werden (Sautter et al. 2011), jedoch zeigte sich die FGF2-Expression im sinonasalen Gewebe von Mäusen mit Rhinosinusitis nach ein- bzw. dreiwöchiger Allergenprovokation mit *Aspergillus fumigatus* im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich unserer Daten signifikant herunterreguliert (Sautter et al. 2012). FGF18 wird Bedeutung in der Entwicklung der Lunge u.a. in Bezug auf die Ausbildung der Knorpelspannen sowie der Bildung von Alveolen zugeschrieben (Elluru et al. 2009; Usui et al. 2004). Inwiefern eine Beteiligung an der Pathogenese der allergischen Atemwegsinflammation besteht, bleibt bislang nicht geklärt.

Dass FGF9 in Zusammenhang mit diversen pneumologischen Krankheitsbildern gebracht werden kann, wurde bereits in verschiedenen Studien belegt. So scheint es als prognostischer Marker für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome in Frage zu kommen und wurde in der fibroproliferativen Region von an idiopathischer pulmonaler Fibrose erkrankten Lungen vermehrt nachgewiesen, wobei die zellulären Mechanismen noch unklar sind (Ohgino et al. 2014; Coffey et al. 2013). Auch in Bezug auf inflammatorische Erkrankungen bestehen Hinweise auf eine Beteiligung von FGF9. Mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) konnten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe erhöhte FGF9-Werte im Ösophagus von Patienten mit eosinophiler Ösophagitis festgestellt werden (Mulder et al. 2009). Auch in unseren Analysen war FGF9 das einzige Zytokin, welches in Folge der Atemwegsinflammation hochreguliert wurde. Ob sich dies auch auf Proteinebene widerspiegelt und welcher funktionelle Einfluss FGF9 im Asthma bronchiale zugeschrieben werden kann, bleibt jedoch Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Unsere Daten erbringen den erstmaligen Nachweis, dass FGFs an Entzündungsvorgängen

in der Lunge beteiligt sein könnten, wobei die funktionelle Relevanz zu Zeit noch unklar ist. Es ist zu berücksichtigen, dass aus der mRNA-Menge allein nicht auf das Proteinlevel geschlossen werden kann. Sollte die Expression der FGFs im allergischen Asthma tatsächlich verändert sein, muss diese Regulation nicht zwingend auf transkriptioneller Ebene erfolgen, sondern es können auch translationale Mechanismen eingeschaltet werden. Eine Studie von Conte et al. aus dem Jahre 2008 untersuchte die regulativen Mechanismen der FGF2-Expression unter hypoxischen Bedingungen in der Haut von Mäusen. Dabei konnte eine ischämisch bedingte Steigerung der Translation (um das Vierfache 24-48 h nach Ischämie) des FGF2-Proteins in der Mäusehaut beobachtet werden. Im Gegenzug reduzierte sich das FGF2-mRNA-Level deutlich (Conte et al. 2008). Die FGF2-Expression wird post-transkriptionell durch diverse untranslationierte Regulationselemente am 3' und 5' Ende der FGF2-mRNA gesteuert (Touriol et al. 1999). Laut der Studie von Conte et al. liegt dem Proteinanstieg ursächlich eine Induktion der *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES)-vermittelten Translation zu Grunde. Bei IRES handelt es sich um ein Regulationselement im untranslationierten 5' Ende der mRNA, welches ohne weitere so genannte Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt, um dadurch die Proteinbiosynthese einzuleiten (Thompson 2012). Nur wenige zelluläre mRNAs in Eukaryoten tragen diese Struktur, darunter sind u.a. FGF1 und FGF2 beschrieben (Martineau et al. 2004; Vagner et al. 1995). Das gängigere Translationssteuerungssystem zellulärer mRNA ist eine speziell am 5' Ende angebundene sogenannte 5'-Cap-Struktur, welche zusammen mit weiteren zellulären Faktoren die Bindung an die eukaryotischen Ribosomen vermittelt. Angenommen wird, dass IRES die Translation unter Bedingungen initiiert, unter denen die klassische Cap-abhängige Translation aufgehoben ist. Neben der bereits erwähnten Hypoxie wird dies auch in anderen zellulären Stresssituation wie Hitzeschock oder Apoptose beschrieben (Gonzalez-Herrera et al. 2006). Der mit dem Proteinanstieg vergesellschaftete Abfall des mRNA-Levels wird wiederum auf ein AU-reiches Instabilitätselement am 3' Ende der untranslatierten FGF2-mRNA zurückgeführt (Touriol et al. 1999). Eine effiziente Translation von FGF2 führt demnach zur Degradation. Diese Daten implizieren, dass die FGF2-Expression auch einer post-transkriptionellen Kontrolle unterliegt, welche Zellen die Möglichkeit eröffnet, den Proteinlevel in Abhängigkeit exogener Stimuli rasch variieren zu können. Die IRES-abhängige Überexpression von FGF2 mit begleitendem Abfall der mRNA wurde bereits in Zusammenhang mit anderen Pathologien wie der diabetischen Angiopathie beobachtet (Gonzalez-Herrera et al. 2006). Es ist nicht

auszuschließen, dass das erniedrigte mRNA-Expressionslevel der FGFs in unserem Mausmodell der allergischen Atemwegsentzündung auch auf den oben beschriebenen Mechanismus zurückzuführen ist. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte 24 h nach der letzten OVA-Allergenchallenge. Auch in der Studie von Conte et al. konnte 24 h nach der zu dermalen Hypoxie führenden Operation der niedrigste mRNA-Gehalt im hypoxischen Gewebe gemessen werden (Conte et al. 2008). Die reinen mRNA-Expressionsanalysen wurde daher durch den Proteinnachweis vervollständigt, wobei eine Quantifizierung des Western Blots vorgenommen werden sollte, um Unterschiede zwischen der OVA- und PBS-Gruppe aufzudecken. Es wurden Versuche unternommen, den Proteinnachweis für alle in der qPCR regulierten FGFs vorzunehmen. Aufgrund fehlender Spezifität der verwendeten Antikörper blieben diese jedoch teilweise erfolglos. Für den Nachweis von FGF2 ist es uns allerdings gelungen, die Spezifität eines Antikörpers nachzuweisen und somit valide Daten zu erheben.

4.5 FGF2 und dessen Regulation im allergischen Asthma bronchiale

In der Western Blot-Analyse konnte FGF2 im Lysat der Mauslunge nachgewiesen werden. Dabei konnten wir entsprechend der Größe der einzelnen Produktbanden sowohl die *Low Molecular Weight* (LMW)-Isoform (18 kDa) als auch die *High Molecular Weight* (HMW)-Isoformen (> 20 kDa) von FGF2 detektieren. In der Maus umfassen die HMW-Isoformen eine 22 und 21,5 kDa schwere Variante, während im Menschen 34, 24, 22,5 und 22 kDa schwere Isoformen identifiziert wurden. Ursächlich stehen den unterschiedlichen molekularen Massen alternative translationale CUG-Startkodons zu Grunde, die sich im Transkript aufwärts des AUG-Startkodons der LMW-Isoform befinden (Bugler et al. 1991; Brigstock et al. 1990). Unterschiede innerhalb der Isoformen bestehen insbesondere in ihrer intrazellulären Lokalisation, aus der verschiedene biologische Effekten resultieren. Die verlängerte N-terminale Sequenz der HMW-Isoformen beinhaltet eine Kernlokalisationssequenz (NLS), die dem Protein Zugang zum Nukleus verschafft, um dort auch ohne die Bindung an einen FGFR biologische Aktivitäten auszuüben (Chlebova et al. 2009). Während die HMW Isoformen überwiegend intranukleär akkumulieren, wird die LMW-Isoform über einen ATP-verbrauchenden, vom Endoplasmatischen Retikulum (ER)-Golgi-Sekretionsweg unabhängigen Mechanismus nach extrazellulär sezerniert, um dort in der extrazellulären Matrix gespeichert zu werden oder mit einem membranständigen FGFR auf parakrinem

oder autokrinen Wege zu interagieren (Mignatti et al. 1992). Ein Beispiel für deren unterschiedliche biologische Effekte liefert eine aktuelle Studie von Santiago et al., welche den Einfluss der FGF2 Isoformen auf das *Remodeling* des Herzmuskels nach Myokardinfarkt untersucht hat. Während der LMW Isoform eine protektive Wirkung im Sinne einer Förderung der Angiogenese zugesprochen wird, scheinen die HMW-Isoformen einen pro-inflammatorischen, pro-fibrotischen und pro-hypertrophen Einfluss auf den strukturellen Umbau im Herzen nach Infarkt auszuüben (Santiago et al. 2014). Welche Effekte die verschiedenen Isoformen beim allergischen Asthma bronchiale haben, ist zurzeit noch unklar. Immunhistochemisch konnte FGF2 in den Zellen des respiratorischen Epithels der Mausbronchioli in der OVA- und PBS-Gruppe eindeutig lokalisiert werden. Auch in der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass das respiratorische Epithel einen wichtigen Synthesort für FGF2 darstellt (Cordon-Cardo et al. 1990), und dass es, induziert durch ein allergisches Asthma, zu einer Zunahme der FGF2-Expression kommen kann (Shute et al. 2004). Im Hinblick auf seine potenzielle Bedeutung in der Pathogenese des Asthmas untersuchten Shute et al. 2004 mit Hilfe der Immunhistochemie die Lokalisation und die relative Häufigkeit von FGF2, wobei sie eine Zunahme der epithelialen Immunmarkierung im Bronchialgewebe der Asthmagruppe gegenüber der gesunden Kontrolle feststellten. Allerdings bestehen Zweifel an der methodischen Durchführung der letztgenannten Studie, die u.a. darin begründet sind, dass die Quantifizierung der epithelialen Immunmarkierung in den Lungenschnitten nicht nach stereologischen Kriterien erfolgte. Zusätzlich ist zu kritisieren, dass der Autor nicht ausreichend Bildmaterial zur Verfügung stellt, um die beschriebenen Daten nachvollziehen zu können. Im Artikel selbst ist beispielsweise lediglich eine immunhistochemische Abbildung der Kontrollgruppe zu finden, während die Gegenüberstellung mit der Asthmagruppe fehlt. Neben dem respiratorischen Epithel weisen diverse Studien auf einen immunhistochemischen Nachweis von FGF2 in Zellen der Submukosa hin (Shute et al. 2004; Hoshino et al. 2001). Hoshino et al. identifizierten die FGF2 positiven Zellen anhand von immunhistochemischen Co-Lokalisationsanalysen mit verschiedenen Markerproteinen als Immunzellen wie Eosinophilen, Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen, welche im Rahmen des allergischen Entzündungsprozesses verstärkt ins Interstitium einwandern (Hoshino et al. 2001).

Zu berücksichtigen ist, dass die beiden zitierten Artikel auf humanen Proben basieren, die mit unseren Proben aus der Maus nicht unmittelbar zu vergleichen sind. Zusätzlich muss angemerkt werden, dass weder Shute et al. noch Hoshino et al. die Spezifität des

Primärantikörpers anhand einer Präabsorptionskontrolle oder an *Knock-out*-Gewebe überprüft haben. Auch wenn uns zur Zeit der Versuchsdurchführung keine FGF2-*Knockout*-Maus zur Verfügung stand, konnten wir anhand der Präabsorptionskontrolle in unseren Experimenten demonstrieren, dass der verwendete Antikörper durch Inkubation an das rekombinante FGF2 binden, und damit geblockt werden konnte.

Wie einleitend erwähnt, werden FGFs gebunden an HSPG als eine Art Reservoir stabiler, aber inaktiver Zytokine in der Basalmembran verschiedener Gewebe gelagert. Laut Literatur gehört FGF2 zu den am meisten in der extrazellulären Matrix gespeicherten Wachstumsfaktoren in der Lunge (Sannes und Wang 1997), wobei insbesondere das Proteoglykan Perlecan für die FGF-Bindung eine Rolle zu spielen scheint (Aviezer et al. 1994). Unsere immunhistochemischen Analysen zeigten keine FGF2-Markierung der endothelialen und epithelialen Basalmembranen. Die Interaktion zwischen dem FGF und den sauren, anionischen Heparinen erfolgt über eine Abfolge basischer Aminosäuren am carboxyterminalen Ende des Peptids (Harper und Lobb 1988). Eine mögliche Ursache für die fehlende Immunmarkierung könnte sein, dass die Bindung des Antikörpers aufgrund der langen Polysaccharidketten der Proteoglykane aus sphärischen Gründen verhindert wird bzw. das Epitop durch die Interaktion des FGFs mit einem Heparinmolekül verlegt ist.

Dass die HSPGs der extrazellulären Matrix und FGF2, insbesondere auch im Rahmen einer allergischen Reaktion, in einer bedeutenden Interaktion zu stehen scheinen, zeigt eine aktuelle Studie von Ge et al.. Grundlage der Versuche stellte eine Maus dar, welche in Folge eines Enzymdefektes unfähig ist, HSPGs zu synthetisieren. Nach OVA-Aerosolprovokation in der OVA-sensibilisierten Maus wurden die inflammatorischen und strukturellen Veränderungen in der Lunge der HSPG-defizienten Mäuse histologisch untersucht und mit denen des Wildtyps verglichen. Die Mäuse mit dem Enzymdefekt zeigten eine deutlich reduzierte Infiltration von Eosinophilen und Makrophagen sowie immunhistochemisch eine geringere Expression von FGF2 in der Lunge im Vergleich zum Wildtyp (Ge et al. 2014). Die Eigenschaft der extrazellulären Matrix zur Speicherung von Wachstumsfaktoren und zur Steuerung von inflammatorischen Prozessen (Parish 2006) lässt vermuten, dass sie Zytokine wie FGF2 mitsamt den von ihnen vermittelten Effekten kontrollieren kann.

Entgegen der ursprünglichen Erwartung kann aus unseren erhobenen Daten nicht auf quantitative Unterschiede in der FGF2-Expression zwischen Asthma- und Kontrollgruppe in der Mauslunge geschlossen werden. Gemessen wurde dabei der FGF2-

Proteingehalt in den entnommenen Lungen nach BAL. Als Reaktion auf die akute allergische Atemwegsinflammation ist aber auch eine rasche, unmittelbare Freisetzung des Zytokins aus seinen Produktions- und Speicherorten in beispielsweise den Blutkreislauf oder die Bronchiallumina möglich. Dies erscheint insbesondere unter der Berücksichtigung, dass FGF2 neben einem exozytotischen Mechanismus alternativ durch die direkte transiente oder permanente Schädigung der Plasmamembran einer Zelle freigesetzt werden kann, naheliegend (McNeil et al. 1989). Aufgrund der Bedeutung der FGFs in Wundheilungs- und Gewebereparaturmechanismen ist dieser Mechanismus gut nachvollziehbar und lässt gleichzeitig annehmen, dass die Freisetzung von FGF2 aus dem respiratorischen Epithel im Asthma u.a. durch die epithelschädigende Wirkung der aus eingewanderten, aktivierten Eosinophilen stammenden toxischen Proteine und reaktiven Sauerstoffspezies erklärt werden kann (Buhl et al. 2011; Filley et al. 1982). Auch diverse Proteasen wie Matrix-Metallproteasen, Thrombin und Kallikrein, welche bei Asthmatikern verstärkt vorhanden sind (Rajah et al. 1999; Christiansen et al. 1992; Terada et al. 2004), können durch proteolytischen Abbau der HSPGs zu der gesteigerten Abgabe extrazellulär gespeicherter FGFs beitragen. Im Nachfolgeprojekt soll daher auch die Menge der freigesetzten FGFs, beispielsweise in der BAL der Versuchstiere, gemessen und quantifiziert werden. Eine geeignete Methode dafür würde der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) darstellen, ein enzymatisches Immunadsorptionsverfahren, was dem Nachweis bestimmter, gelöster Moleküle dient. Eine vergleichbare Fragestellung, jedoch auf der Grundlage humaner Proben, stellte die schon einleitend erwähnte Studie von Redington et al. aus dem Jahre 2001 auf, bei der in der BAL von Asthmatikern gegenüber gesunden Kontrollen mittels ELISA signifikant erhöhte Werte von FGF2 nachgewiesen werden konnten. Insbesondere 10 Minuten nach segmentaler Allergenprovokation war bereits ein fünffacher Anstieg des FGF2-Levels in der BAL nachweisbar (Redington et al. 2001). Da der ELISA die Verwendung von zwei spezifischen Antikörpern voraussetzt und es sich schwierig gestaltete, zuverlässige gegen Maus-FGF2 gerichtete Antikörper zu finden, war es für uns bislang nicht möglich, einen ELISA für FGF2 der Maus in unserem Labor zu etablieren.

Bezüglich der Pathophysiologie des Asthma bronchiale gehört FGF2 bislang zu den am intensivsten, teilweise aber kontrovers diskutierten FGFs. Seine Effekte scheint es auf direktem, aber auch auf indirektem Wege durch die Interaktion mit Mediatoren, die im Asthma verstärkt nachweisbar sind, wie dem Transforming growth factor- β (TGF- β), zu vermitteln. TGF- β ist ein potenter, profibrogenen Faktor, welcher einen wesentlichen

Kandidaten für die Initiierung und Persistenz des *Airway Remodeling* darstellt (Boxall et al. 2006). Unter anderem stimuliert TGF- β die glatte Atemwegsmuskulatur zur Ausbildung eines hypertrophen und kontraktiven Phänotyps, indem es die Expression kontraktiver Proteine wie Transgelin (SM22) fördert (Goldsmith et al. 2006). Auf der einen Seite existieren Studien, welche aufzeigen, dass FGF2 dazu in der Lage ist, die TGF- β -induzierte Differenzierung der Atemwegsmuskulatur zu einem kontraktieren, hypertrophierten Phänotyp zu antagonisieren und sogar umzukehren (Schuliga et al. 2013). Laut einer Studie von Jeon et al. aus dem Jahre 2007 mindert die vor jeder Allergenprovokation durchgeführte subkutane Applikation von rekombinantem FGF2 die anhand des Methacholinprovokationstests gemessene AHR sowie die Mukusproduktion und die BAL-GZZ sensibilisierter Mäuse im akuten Asthmodell (Jeon et al. 2007). Dieser protektiven Eigenschaft von FGF2 stehen kontroverse Studien gegenüber, welche das Zytokin wiederum nicht zuletzt aufgrund seinen potenten mitogenen Effekte auf die glatte Atemwegsmuskulatur, Fibroblasten und Endothelzellen der Lunge (Xiao et al. 2012; Sahni und Francis 2004; Ravenhall et al. 2000; Ediger und Toews 2000) als wichtigen Faktor in der Pathogenese des Atemwegsumbaus betrachten (Bossé et al. 2006). Nach dieser Theorie sollen TGF- β und FGF2 wiederum synergistisch miteinander interagieren, um deren proliferationsfördernden Einfluss wechselseitig zu verstärken (Xiao et al. 2012; Bossé et al. 2006). Es wird deutlich, dass der Einfluss von FGF2 auf die Pathogenese des Asthmas komplex zu sein scheint und Gegenstand weiterer funktioneller Versuche werden sollte. Insbesondere in Hinblick auf unsere ursprüngliche Fragestellung, die auf Veränderungen in der Innervation der asthmatischen Lungen abzielt, haben wir deshalb den Einfluss von FGFs auf das Nervenfasernwachstum sensorischer Neurone anhand eines Neuriten-Auswachsassays untersucht.

4.6 Funktionelle Bedeutung der FGFs auf sensorische Neurone

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der FGFR1 IIIc-Variante auf sensorischen vagalen C-Faser-Neuronen und deren Liganden in der Lunge von Mäusen nachgewiesen werden. Damit ist die Grundvoraussetzung für einen funktionellen Einfluss der FGFs auf sensorische C-Faser-Neurone gegeben. Dass das FGF *Signaling* im Nervensystem generell von zentraler Bedeutung ist, konnte bereits in diversen Studien belegt werden. So spielt es zum einen in der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems in Hinblick auf die Neurogenese, neuronale Differenzierung und

synaptische Plastizität eine tragende Rolle (Eckenstein et al. 1990; Ferrari et al. 1989; Li et al. 2009), übt mitogene Effekte auf Gliazellen aus (Davis und Stroobant 1990; Engele und Bohn 1992) und trägt zur Regenerationsfähigkeit von Nervenzellen bei (Cordeiro et al. 1989). Insbesondere werden den FGFs, ähnlich wie NGF oder BDNF, neurotrophe Eigenschaften zugesprochen, die mit einer Stimulation des Nervenfasernwachstums einhergehen. Da in der Pathogenese des allergischen Asthmas eine Hyperinnervation der Atemwege mit sensorischen Neuronen beobachtet wird (Goldie et al. 2001), besteht Grund zur Annahme, dass FGFs maßgeblich an diesem Prozess beteiligt sein könnten. In dem Zusammenhang wurde mit Hilfe des Auswachsassays der Einfluss von FGFs auf das Auswachsen sensorischer Nervenfasern *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit rekombinantem FGF1 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Nervenfasernlänge sensorischer Neurone des JNG führt. Hingegen konnte für FGF2 kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Die Wirkung von FGFs auf das Nervenfasernwachstum wurde bereits in früheren Publikationen diskutiert. Die meisten Studien fokussieren sich dabei insbesondere auf den regenerationsfördernden Effekt von FGF1 und FGF2 nach Nervenfaserverletzung. Dieser wurde beispielsweise in einer *in vivo* Studie von Politis et al. bildlich demonstriert. Dabei wurde in Ratten der N. ischiadicus durchtrennt und dem Nervenstumpf ein Y-förmiges Röhrchen aufgesetzt, von welchem ein Schenkel mit FGF1 und der andere mit reinem HBSS beschichtet waren. Nach drei Wochen wurde der Nerv entnommen und lichtmikroskopisch die Anzahl aller regenerierten, myelinisierten Axone ermittelt. Es zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle deutliche Steigerung der Nervenfasernzahl nach FGF1-Stimulation (Politis 1986). Eine Differenzierung zwischen sensorischen und motorischen Fasern fand in der Studie jedoch nicht statt.

Auch für FGF2 wird in diversen Studien eine neurotrophe Funktion diskutiert. In DRGs und im proximalen und distalen Nervenstumpf kann nach peripherer Nervenverletzung eine signifikante Steigerung der FGF2-Expression sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene verzeichnet werden (Meisinger und Grothe 1997). In einer Studie von Haastert et al. wird der regenerationsfördernde Effekt von transplantierten FGF2-überexprimierenden Schwanzzellen auf sensorische Neurone des durchtrennten Nervus ischiadicus der Ratte demonstriert (Haastert et al. 2006). Eine weitere Studie beschreibt auf der Grundlage eines *in vitro* Experiments die stimulierende Wirkung der 18 kDa FGF2-Isoform auf das Nervenfasernlängenwachstum und Nervenfaserverzweigung von Motoneuronen nach Neurotmesis (Allodi et al. 2013). Interessanterweise wird im Falle

von FGF2 funktionell zwischen den FGF-Isoformen unterschieden. Während die LMW-Isoform das Nervenfaserverwachstum motorischer Neurone zu fördern scheint, sollen die HMW-Isoformen wiederum neurotrophe Effekte auf sensorische Neurone ausüben (Haastert et al. 2006; Allodi et al. 2013). Würde man davon ausgehen, dass auch das Nervenfaserverwachstum der sensorischen Neurone des JNG vorwiegend durch die HMW-Isoformen stimuliert wird, ließe sich erklären, warum die externe Applikation des rekombinanten FGF2 zu keinem signifikanten Auswachsen geführt hat. Wie bereits beschrieben, akkumulieren die HMW-Isoformen überwiegend im Nukleus und interagieren unabhängig von FGFRs in der Zellmembran (Chlebova et al. 2009). Dabei scheint der profunde Unterschied in der funktionellen Bedeutung der verschiedenen Isoformen weniger in deren Proteineigenschaften an sich, als in der intrazellulären Sortierung zu liegen (Sørensen et al. 2006). Um den Effekt der HMW-Isoformen auf das Nervenwachstum sensorischer Fasern zu testen, könnte es daher von Nöten sein, das rekombinante FGF artifiziell in den Nukleus der kultivierten Zelle zu applizieren.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte auf das Nervenfaserverwachstum durch die direkte Interaktion zwischen FGFs und dem membranösen Rezeptor zurückzuführen sind, sollte außerdem in weiterführenden Untersuchungen ein selektiver FGFR1-Blocker eingesetzt werden. In der bereits erwähnten Studie von Allodi et al. konnte beispielsweise durch die Blockade des FGFR1 ein Rückgang des Nervenfaserverwachstums nach FGF2-Stimulation festgestellt werden (Allodi et al. 2013). Alternativ wäre auch zu diskutieren, ob FGFs indirekt, beispielsweise durch die Stimulation zur Produktion bzw. Ausschüttung anderer neurotropher Faktoren, auf das Nervenfaserverwachstum wirken. Grund zu dieser Fragestellung liefert eine Studie, welche aufzeigt, dass FGF1 und FGF2 kultivierte Astrozyten zur Produktion und Sekretion von NGF anregen können. Auf diesem Weg könnten Nervenfasern wiederum zum Auswachsen stimuliert werden, ohne dass eine direkte Interaktion mit dem FGFR der Neurone stattfindet (Yoshida und Gage 1991). Unsere Studie bietet Hinweise darauf, dass FGFs sensorische Neurone des JNG im Nervenfaserverwachstum beeinflussen können. Inwieweit dieser Prozess an der Pathogenese der AHR im Asthma bronchiale beteiligt ist, soll Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben.

4.7 Schlussfolgerung

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse stützen die zu Beginn aufgestellte Hypothese, dass FGFs beim allergischen Asthma bronchiale mit sensorischen Neuronen interagieren können. Insbesondere gewährleistet die Expression des FGFR1 IIIc in den C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum sowie die Expression der FGF-Liganden in der Lunge die Voraussetzung einer Interaktion, die sich in unseren Versuchen entzündungsabhängig darstellt. Erste funktionelle Versuche zeigen, dass FGFs dazu in der Lage sein könnten, das neuronale Netzwerk aus sensorischen Nervenfasern in der Lunge zu verdichten. Obwohl eine *in vivo* Relevanz aktuell unklar ist, bietet die Studie erste Hinweise auf eine wichtige Bedeutung der FGFR1-FGF-Interaktion, die, u.a. auch aufgrund der teils kontroversen Datenlage eigener und bereits publizierter Ergebnisse, detaillierter untersucht werden muss. Potenziell ist es vorstellbar, dass eine Fehlregulation dieses Systems an der neuronalen Hyperreagibilität mitwirkt bzw. Einfluss auf die neurogene Entzündung im allergischen Asthma nimmt.

5. Zusammenfassung

Das allergische Asthma bronchiale ist eine inflammatorische Erkrankung, die mit einer AHR assoziiert ist. Letztere ist charakterisiert durch Symptome wie Husten, Dyspnoe und gesteigerte Schleimsekretion nach Exposition mit diversen sog. unspezifischen Umweltirritanzien. Bislang ist deren Pathomechanismus nicht vollständig verstanden, jedoch bestehen Hinweise darauf, dass eine Dysregulation bronchopulmonaler C-Faser-Neurone an der Entstehung der AHR beteiligt ist. Die Varikositäten dieser Nervenfasern sind häufig nahe der Basalmembran lokalisiert. Ein Bestandteil derer sind HSPGs, die verschiedene FGFs extrazellulär binden können. Einzelne FGFs, so beispielsweise FGF2, werden von Bronchialepithelzellen synthetisiert und sind in erhöhten Konzentrationen in der BAL und im Sputum von Patienten mit allergischem Asthma nachweisbar. Wir stellten die Hypothese auf, dass FGFs mit sensorischer Neuronen interagieren können und sich ferner diese Kommunikation im Asthma verändert. Mit Hilfe eines Mausmodells der akuten allergischen Atemwegsentzündung zeigt die vorliegende Arbeit erstmals anhand von *single-cell*-RT-PCR-Analysen, dass der FGFR1 IIIc in C-Faser-Neuronen des Ggl. nodosum von Mäusen mit und ohne Atemwegsinfektion exprimiert wird. Untersuchungen der mRNA-Expression der FGFR1 IIIc-Liganden mittels *standard*- und qRT-PCR demonstrieren, dass verschiedene FGFs in der Mauslunge exprimiert werden, und dass in vielen Fällen eine allergeninduzierte Regulation der mRNA-Expression stattfindet. Der Nachweis von FGF2, dem im Bezug aufs Asthma am intensivsten diskutierten FGF, konnte mit Hilfe der Immunhistochemie und Western Blot-Analyse in der Mauslunge auf Proteinebene vervollständigt und das respiratorische Epithel als Synthesequelle dargestellt werden. Außerdem konnten anhand eines Neuriten-Auswachsassays funktionelle Hinweise auf einen neurotrophen Effekt von FGFs auf vagale sensorische Neurone erzielt werden. Zusammenfassend weisen unsere Daten darauf hin, dass das FGF-FGFR1 IIIc-System eine Kommunikation zwischen Lunge und sensorischen Nervensystem erlaubt und infolge der allergischen Entzündung einer Regulation unterliegt. Diese Kenntnisse stellen die essenzielle Grundlage zukünftiger Untersuchungen dar, in denen geklärt werden soll, ob und auf welchem Wege die FGF-Familie die Exzitabilität der bronchopulmonalen C-Faser-Neurone unmittelbar oder nachhaltig beeinflusst, sowie ferner ein Target für die zukünftige Asthmatherapie darstellt.

6. Summary

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of the respiratory tract which is associated with an airway hyperreactivity (AHR). AHR is characterized by cough, dyspnea and an enhanced mucus production after exposure to a high variety of environmental irritants. The underlying pathomechanisms of AHR remain unclear. However, a hyperinnervation of the airways has been shown in asthma, and evidence has been provided that a dysregulation in the function of sensory C-fibers innervating the airways is involved in the development of AHR. Nerve endings of C-fibers are located in close vicinity of the basal membrane and between cells of the respiratory epithelium. The basal membrane contains HSPGs, which can extracellularly bind members of the FGF family. FGFs, e.g. FGF2, are expressed by bronchial epithelial cells. Increased levels of FGF2 have been demonstrated in BAL and sputum of patients with allergic asthma. The aim of our study was to investigate if FGFs are capable to influence the function of sensory neurons in mice with and without an allergic airway inflammation. Retrograde tracing was performed in a mouse model of OVA-induced airway inflammation and individual airway-innervating neurons from the jugular nodose complex were isolated. *Single-cell*-RT-PCR analysis revealed that FGFR1 IIIc was predominantly expressed in nodose C-fibers of mice with and without airway inflammation. In order to investigate if FGFR1 IIIc ligands were expressed in mouse lungs, we performed RT-PCR and subsequently quantified mRNA of constitutively expressed FGFs by qRT-PCR. Our results indicate that expression of different FGFs in mouse lungs is modulated during allergic airway inflammation. Protein expression of FGF2, a factor that has been shown to be elevated in sputum samples of patients with asthma, was detected by Western Blot. Further analysis by immunohistochemistry revealed that cells of the respiratory epithelium are the primary source of FGF2. In order to investigate possible effects of FGF on sensory neuron function, we performed a neurite outgrowth assay which showed that FGFs exert a neurotrophic effect on vagal sensory neurons. In summary, our data indicate that interaction of FGFs with FGFR1 IIIc in the lung represents a possible communication pathway between epithelial cells and sensory C-fibers that might be involved in the pathogenesis of allergic asthma. These data provide the basis for further investigation deciphering the role of FGFs in vivo and as a potential target for treatment of allergic asthma.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
bidest.	bidestilliert
BLAST	<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
d	<i>Days</i>
dest.	destilliert
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMP	2, 2 Dimethoxypropan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i>
DTT	Dithiothreitol
D1	immunglobulinähnliche Domäne I
D2	immunglobulinähnliche Domäne II
D3	immunglobulinähnliche Domäne III

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECP	<i>Eosinophil Cationic Protein</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EF50	expiratorische Flow bei 50 % des Ausatemvolumens
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FEV ₁	forcierte Einsekundenkapazität
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor-Rezeptor</i>
fwd.	<i>forward</i>
Ggl.	Ganglion
Ggll.	Ganglia
GZZ	Gesamtzellzahl
HBSS	<i>Hanks ' Balanced Salt Solution</i>
HE-Färbung	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
HS	<i>Horse Serum</i>
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan</i>
Ig	Immunglobuline
IgE	Immunglobuline der Klasse E
IgG	Immunglobuline der Klasse G
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
i.t.	intratracheal
JNG	Ganglion jugulare et nodosum
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
Lsg	Lösung
MAP-Kinase	<i>Mitogen-Activated Protein-Kinase</i>
MBP	<i>Major Basic Protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
NGF	<i>Neuronal Growth Factor</i>
NK	Negativkontrolle
NKA	Neurokinin A
n.s.	nicht signifikant
OCT	<i>Optimum Cutting Temperature Compound</i>
OVA	Ovalbumin
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff-Färbung</i>
PBS	<i>Phosphat-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	<i>Protein Gene Product 9.5</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PP	Phosphatpuffer
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RARs	<i>Rapidly Adapting Stretch Receptors</i>
rev.	<i>reversed</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SB	Standardbedingungen
SD	<i>Standard Deviation</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-Page	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SARs	<i>Slowly Adapting Stretch Receptors</i>

SP	Substanz P
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	<i>Tris Buffered Solution</i>
TRPA1	<i>Transient Receptor Potential Subfamily A, Member 1</i>
TRPV1	<i>Transient Receptor Potential vanilloid 1</i>
TTBS	<i>Tween Tris Buffered Saline</i>
U	<i>Units</i>
U-Test	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
χ^2 -Test	Chi-Quadrat-Vierfeldertest

8. Literaturverzeichnis

- Alarie, V. (1998): Computer-based bioassay for evaluation of sensory irritation of airborne chemicals and its limit of detection. In: *Archives of Toxicology* 72, S. 277–282.
- Allodi, I.; Casals-Díaz, L.; Santos-Nogueira, E.; Gonzalez-Perez, F.; Navarro, X.; Udina, E. (2013): FGF-2 low molecular weight selectively promotes neuritogenesis of motor neurons in vitro. In: *Molecular neurobiology* 47 (2), S. 770–781.
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology: FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1). Available from www.atlasgeneticsoncology.org//Genes/FGFR1113.html.
- Aviezer, D.; Hecht, D.; Safran, M.; Eisinger, M.; David, G.; Yayon, A. (1994): Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. In: *Cell* 79 (6), S. 1005–1013.
- Bandell, M.; Story, G. M.; Hwang, S. W.; Viswanath, V.; Eid, S. R.; Petrus, M. J. et al. (2004): Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. In: *Neuron* 41 (6), S. 849–857.
- Barnes, P. J. (1986): Asthma as an axon reflex. In: *Lancet* 1 (8475), S. 242–245.
- Barnes, P. J. (1992): Modulation of Neurotransmission in Airways. In: *Physiological reviews* 72 (699-729).
- Barnes, P. J. (1995): Overview of neural mechanisms in asthma. In: *Pulmonary pharmacology* 8 (4-5), S. 151–159.
- Barnes, P. J. (1996): Neuroeffector mechanisms: the interface between inflammation and neuronal responses. In: *The journal of allergy and clinical immunology* 98, S. 73–81.
- Bautista, D. M.; Jordt, S.E.; Nikai, T.; Tsuruda, P. R.; Read, A. J.; Poblete, J. et al. (2006): TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. In: *Cell* 124 (6), S. 1269–1282.
- Beer, H. D.; Vindevoghel L., Gait M.J.; Revest J.M.; Duan D.R.; Mason I.; Dickson C.; Werner S. (2000): Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 1-IIIb Is a Naturally Occurring Functional Receptor for FGFs That Is Preferentially Expressed in the Skin and the Brain. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (21), S. 16091–16097
- Belvisi, M.G. (2002): Overview of the innervation of the lung. In: *Current Opinion in Pharmacology* 2 (3), S. 211–215. Review
- Belvisi, M. G. (2003): Sensory nerves and airway inflammation: role of A δ and C-fibres. In: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 16 (1), S. 1–7. Review.
- Bissonnette, É.Y.; Madore, A. M.; Chakir, J.; Laviolette, M.; Boulet, L. F.; Hamid, Q. et al. (2014): Fibroblast growth factor-2 is a sputum remodeling biomarker of severe asthma. In: *The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma* 51 (2), S. 119–126.
- Blyth, D.; Pedrick M.S.; Savage T.J.; Hessel E.M.; Fattah D. (1996): *Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma*. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 14 (5), S. 425-438

Bob, A.; Bob, K. (2001): Innere Medizin. Duale Reihe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Borger, P.; Tamm, M.; Black, J. L.; Roth, M. (2006): Asthma: is it due to an abnormal airway smooth muscle cell? In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174 (4), S. 367–372.

Bossé, Y.; Thompson, C.; Stankova, J.; Rola-Pleszczynski, M. (2006): Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34 (6), S. 746–753.

Boxall, C.; Holgate, S. T.; Davies, D. E. (2006): The contribution of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. In: *The European respiratory journal* 27 (1), S. 208–229.

Braun, A.; Appel, E.; Baruch, R.; Herz, U.; Botchkarev, V.; Paus, R. et al. (1998): Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. In: *European Journal of immunology* 28 (10), S. 3240–3251.

Braun, A.; Lommatzsch, M.; Lewin, G. R.; Virchow, J. C.; Renz, H. (1999a): Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? In: *International archives of allergy and immunology* 118 (2-4), S. 163–165.

Braun, A.; Lommatzsch, M.; Mannsfeldt, A.; Neuhaus-Steinmetz, U.; Fischer, A.; Schnoy, N. et al. (1999b): Cellular sources of enhanced brain-derived neurotrophic factor production in a mouse model of allergic inflammation. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21 (4), S. 537–546.

Brigstock; Klagsbrun, M.; Sasse, J.; Farber, P. A.; Iberg, N. (1990): Species-specific high molecular weight forms of basic fibroblast growth factor. In: *Growth Factors* 4 (1), S. 45–52.

Brody, A. R.; Hook, G. E.; Cameron, G. S.; Jetten, A. M.; Butterick, C. J.; Nettesheim, P. (1987): The differentiation capacity of Clara cells isolated from the lungs of rabbits. In: *Laboratory investigations: a journal of technical methods and pathology* 57 (2), S. 219–229.

Bugler, B.; Amalric, F.; Prats, H. (1991): Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. In: *Molecular and cellular biology* 11 (1), S. 573–577.

Buhl, R.; Grabbe, S.; Klimek, L.; Knop, J.; Mann, W.; Saloga, J. (2011): Allergologie-Handbuch. Grundlagen und klinische Praxis. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH.

Burgel, P. R.; Nadel, J. A. (2004): Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. In: *Thorax* 59 (11), S. 992–996.

Burgess, W. H.; Maciag, T. (1989): The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. In: *Annual review of biochemistry* 58, S. 575–606.

Clapham, D.E. (2003): TRP channels as cellular sensors. In: *Nature* 426 (6966), S. 517–524. Review.

- Caterina, M. J.; Schumacher, M. A.; Tominaga, M.; Rosen, T. A.; Levine, J. D.; Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. In: *Nature* 389 (6653), S. 816–824.
- Chehade, M.; Sampson, H. A. (2008): Epidemiology and etiology of eosinophilic esophagitis. In: *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* 18 (1), S. 33–44.
- Chlebova, K.; Bryja, V.; Dvorak, P.; Kozubik, A.; Wilcox, W. R.; Krejci, P. (2009): High molecular weight FGF2: the biology of a nuclear growth factor. In: *Cellular and molecular life science* 66 (2), S. 225–235.
- Christiansen, S. C.; Proud, D.; Sarnoff, R. B.; Juergens, U.; Cochrane, C. G.; Zuraw, B. L. (1992): Elevation of tissue kallikrein and kinin in the airways of asthmatic subjects after endobronchial allergen challenge. In: *The American review of respiratory disease* 145 (4 Pt 1), S. 900–905.
- Chung, K. F.; Pavord, I. D. (2008): Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough. In: *Lancet* 371 (9621), S. 1364–1374.
- Cockcroft, D. W.; Davis, B. E. (2006): Mechanisms of airway hyperresponsiveness. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 118 (3), S. 551–559. Review.
- Coffey, E.; Newman, D. R.; Sannes, P. L. (2013): Expression of fibroblast growth factor 9 in normal human lung and idiopathic pulmonary fibrosis. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 61 (9), S. 671–679
- Coleridge, H. M.; Coleridge, J. C. (1977): Impulse activity in afferent vagal C-fibres with endings in the intrapulmonary airways of dogs. In: *Respiration Physiology* 29 (2), S. 125–142.
- Coleridge, H. M.; Coleridge, J.C. (1994): Pulmonary Reflexes: Neural Mechanisms of Pulmonary Defense. In: *Annual review of physiology* 56, S. 69–91.
- Coleridge, J. C.; Coleridge, H. M. (1984): Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 99, S. 1–110.
- Conte, C.; Riant, E.; Toutain, C.; Pujol, F.; Arnal, J. F.; Lenfant, F.; Prats, A. C. (2008): FGF2 translationally induced by hypoxia is involved in negative and positive feedback loops with HIF-1alpha. In: *PLoS ONE* 3 (8), S. e3078.
- Cordeiro, P. G.; Seckel, B. R.; Lipton, S. A.; D'Amore, P. A.; Wagner, J.; Madison, R. (1989): Acidic fibroblast growth factor enhances peripheral nerve regeneration in vivo. In: *Plastic and reconstructive surgery* 83 (6), S. 1013–1019.
- Cordon-Cardo, C.; Vlodaysky, I.; Haimovitz-Friedman, A.; Hicklin, D.; Fuks, Z. (1990): Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. In: *Laboratory investigations: a journal of technical methods and pathology* 63 (6), S. 832–840.
- Dalsgaard, C. J.; Lundberg J.M. (1984): Evidence for a spinal afferent innervation of the guinea pig lower respiratory tract as studied by the horseradish peroxidase technique. In: *Neuroscience letters* 45 (2), S. 117–122.
- Davis, J. B.; Stroobant, P. (1990): Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. In: *The journal of cell biology* 110 (4), S. 1353–1360.

- Doidge, J. M.; Satchell, D. G. (1982): Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airways. In: *Journal of the autonomic nervous system* 5 (2), S. 83–99.
- Donnerer, J.; Schuligoi, R.; Stein, C. (1992): Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. In: *Neuroscience* 49 (3), S. 693–698.
- Eckenstein, F. P.; Esch, F.; Holbert, T.; Blacher, R. W.; Nishi, R. (1990): Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors. In: *Neuron* 4 (4), S. 623–631.
- Ediger, T. L.; Toews, M. L. (2000): Synergistic stimulation of airway smooth muscle cell mitogenesis. In: *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 294 (3), S. 1076–1082.
- Elias, J. A. (2000): Airway Remodeling in Asthma. Asthma: The Important Questions Part 4. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, S. 168–171.
- Elluru, R. G.; Thompson, F.; Reece, A. (2009): Fibroblast growth factor 18 gives growth and directional cues to airway cartilage. In: *The Laryngoscope* 119 (6), S. 1153–1165.
- Engle, J.; Bohn, M. C. (1992): Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) on glial precursor cell proliferation: age dependency and brain region specificity. In: *Developmental Biology* 152 (2), S. 363–372.
- Eswarakumar, V. P.; Lax I.; Schlessinger, J. (2005): Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 (2), S. 139–149.
- Ferrari, G.; Minozzi, M. C.; Toffano, G.; Leon, A.; Skaper, S. D. (1989): Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. In: *Developmental Biology* 133 S.140-147.
- Filley, W. V.; Kephart, G. M.; Holley, K. E.; Gleich, G. J. (1982): Identification by Immunofluorescence of Eosinophil Granule Major Basic Protein in Lung Tissues of Patients with Bronchial Asthma. In: *The Lancet* 320, S. 11–16.
- Fischer, A.; McGregor, G. P.; Saria, A.; Philippin, B.; Kummer, W. (1996): Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. In: *The journal of clinical investigation* 98 (10), S. 2284–2291.
- Fischer A.; Canning B.J.; Kummer, W. (1996): Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 805, S. 717–722.
- Flaumenhaft, R.; Moscatelli, D.; Rifkin, D. B. (1990): Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. In: *The journal of cell biology* 111 (4), S. 1651–1659.
- Florkiewicz, R. Z.; Shibata, F.; Barankiewicz, T., Baird, A.; Gonzalez, A. M.; Florkiewicz, E.; Shah, N. (1991): Basic Fibroblast Growth Factor Gene Expression. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 638, S. 109–126.

- Fryer, A. D.; Jacoby, D. B. (1998): Muscarinic receptors and control of airway smooth muscle. In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158 (5 Pt 3), S. 154–160.
- Ge, X. N.; Ha, S. G.; Rao, A.; Greenberg, Y. G.; Rushdi, M. N.; Esko, J. D. et al. (2014): Endothelial and leukocyte heparan sulfates regulate the development of allergen-induced airway remodeling in a mouse model. In: *Glycobiology*. 24 (8), S. 715–727
- Gell, P.G.H.; Coombs, R.R.A. (1963): The classification of allergic reactions underlying disease. In: *Clinical Aspects of Immunology*.
- Geppetti, P.; Materazzi, S.; Nicoletti, P. (2006): The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease 533 (1-3), S. 207–214.
- Ghafouri-Fard, S.; Abbasi, F.; Azizi, F.; Javaheri, M.; Mehdizadeh, M.; Setoodeh, A. (2014): Hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome (HHS): report of two cases with a recurrent mutation and review of the literature. In: *Journal of pediatric endocrinology & metabolism*.
- From the Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, Global Initiative for Asthma (GINA) 2015. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
- Glaab, T.; Taube, C.; Braun, A.; Mitzner, W. (2007): Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice. In: *Respiratory research* 8 (1), S. 63.
- Goldfarb, M. (1996): Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. In: *Cytokine & Growth Factor Reviews* 7 (4), S. 311–325.
- Goldie, R. G.; Rigby, P. J.; Fernandes, L. B.; Henry, P. J. (2001): The impact of inflammation on bronchial neuronal networks. In: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 14 (3), S. 177–182.
- Goldsmith, A. M.; Bentley, J. K.; Zhou, L.; Jia, Y.; Bitar, K. N.; Fingar, D. C.; Hershenson, M. B. (2006): Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle hypertrophy. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34 (2), S. 247–254.
- Gonzalez-Herrera, I. G.; Prado-Lourenco, L.; Teshima-Kondo, S.; Kondo, K.; Cabon, F.; Arnal, J. F. et al. (2006): IRES-dependent regulation of FGF-2 mRNA translation in pathophysiological conditions in the mouse. In: *Biochemical Society transactions* 34 (1), S. 17–21.
- Gospodarowicz, D. (1975): Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. In: *The Journal of biological chemistry* 250 (7), S. 2515–2520.
- Gospodarowicz, D.; Bialecki, H.; Greenburg, G. (1978): Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. In: *The Journal of biological chemistry* 253 (10), S. 3736–3743.
- Gospodarowicz, D.; Cheng, J. (1986): Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. In: *Journal of cellular physiology* 128 (3), S. 475–484.
- Haastert, K.; Lipokatic, E.; Fischer, M.; Timmer, M.; Grothe, C. (2006): Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. In: *Neurobiology of disease* 21 (1), S. 138–153.

- Harper, J. W.; Lobb, R. R. (1988): Reductive methylation of lysine residues in acidic fibroblast growth factor: effect on mitogenic activity and heparin affinity. In: *Biochemistry* 27 (2), S. 671–678.
- Hayashi, T. (2012): Molecular Mechanisms of Metaplasia, Differentiation and Hyperplasia of Goblet Cell in Allergic Asthma. In: *Journal of Allergy & Therapy* 3 (03).
- Herold, G. (2013): Herold Innere Medizin. Köln: Gerd Herold.
- Herz, U.; Lumpp, U.; Da Palma, J. C.; Enssle, K.; Takatsu, K.; Schnoy, N. et al. (1996): The relevance of murine animal models to study the development of allergic bronchial asthma. In: *Immunology and cell biology* 74 (2), S. 209–217.
- Hines, E. A.; Sun, X. (2014): Tissue Crosstalk in Lung Development. In: *Journal of cellular biochemistry*. 115 (9), S. 1469-1477
- Hoshikawa, M.; Ohbayashi, N.; Yonamine, A.; Konishi, M.; Ozaki, K.; Fukui, S.; Itoh, N. (1998): Structure and expression of a novel fibroblast growth factor, FGF-17, preferentially expressed in the embryonic brain. In: *Biochemical and biophysical research communication* 244 (1), S. 187–191.
- Hoshino, M.; Takahashi, M.; Aoike, N. (2001): Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 107 (2), S. 295–301.
- Huang, J. J.; Joh, J. W.; Fuentebella, J.; Patel, Anup; N., Tammie; Scott Seki et al. (2010): Eotaxin and FGF enhance signaling through an extracellular signal-related kinase (ERK)-dependent pathway in the pathogenesis of Eosinophilic esophagitis. In: *Allergy, asthma, and clinical immunology: official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 6 (1), S. 25.
- Huber, H. L.; Koessler, K. K. (1922): The pathology of bronchial asthma. In: *Archives of Internal Medicine* 30, S. 689–760.
- Hudemann, C.; Pfefferle, P.; Renz, H. (2010): Entstehung und Analyse von allergischem Asthma bronchiale. In: *Biospektrum* 17.
- Itoh, N. (2007): The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 30 (10), S. 1819–1825.
- Itoh, N.; Ornitz, D. M. (2010): Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. In: *Journal of Biochemistry* 149 (2), S. 121–130.
- Jeon, S. G.; Lee, C. G.; Oh, M. H.; Chun, E. Y.; Gho, Y. S.; Cho, S. H. et al. (2007): Recombinant basic fibroblast growth factor inhibits the airway hyperresponsiveness, mucus production, and lung inflammation induced by an allergen challenge. In: *The journal of allergy and clinical immunology* 119 (4), S. 831–837.
- Jia, Y.; Lee, L. Y. (2007): Role of TRPV receptors in respiratory diseases. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (8), S. 915–927.
- Jin, Y.; Pasumarthi, K. B.; Bock M.E.; Lytras, A.; Kardami, E.; Cattini, P. A. (1994): Cloning and Expression of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 Isoforms in the Mouse

- Heart: Evidence for Isoform Switching During Heart Development 26 (11), S. 1449–1459.
- Johnson, D. E.; Lee, P. L.; Lu, J.; Williams, L. T. (1990): Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. In: *Molecular and cellular biology* 10 (9), S. 4728–4736.
- Johnson, D. E.; Williams, L. T. (1993): Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. In: *Advances in cancer research* 60, S. 1–41.
- Johnson, D.E.; Lu, J.; Chen, H.; Werner, S.; Williams, L. T. (1991): The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. In: *Molecular and cellular biology* 11 (9), S. 4627–4634.
- Joo, S.; Kau, A. L. (2013): The Washington manual allergy, asthma, and immunology subspecialty consult. 2. Aufl. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health (Washington manual subspecialty consult series).
- Kay, A. B. (1991): Asthma and inflammation. In: *The journal of allergy and clinical immunology* 87 (5), S. 893–910.
- Kollarik, M.; Dinh, Q. T.; Fischer, A.; Udem, B. J. (2003): Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. In: *The Journal of Physiology* 551 (3), S. 869–879.
- Kummer, W.; Fischer, A.; Kurkowski, R.; Heym, C. (1992a): The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. In: *Neuroscience* 49 (3), S. 715–737.
- Kummer, W.; Fischer, A.; Mundel, P.; Mayer, B.; Hoba, B.; Philippin, B.; Preissler, U. (1992b): Nitric oxide synthase in VIP-containing vasodilator nerve fibres in the guinea-pig. In: *Neuroreport* 3 (7), S. 653–655.
- Kummer, W.; Lips, K. S.; Pfeil, U. (2008): The epithelial cholinergic system of the airways. In: *Histochem. Cell Biol.* 130 (2), S. 219–234.
- Levi-Montalcini, R. (1987): The nerve growth factor 35 years later. In: *Science* 237 (4819), S. 1154–1162.
- Li, S.; Christensen, C.; K hler, L. B.; Kiselyov, V. V.; Berezin, V.; Bock, E. (2009): Agonists of Fibroblast Growth Factor Receptor Induce Neurite Outgrowth and Survival of Cerebellar Granule Neurons 69 (13), S. 837–854.
- Lindsay, R. M.; Harmar, A. J. (1989): Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. In: *Nature* 337 (6205), S. 362–364.
- Liu, W. Y.; Huang, S.; Shi K.Q.; Zhao, C. C.; Chen, L. L.; Braddock, M. et al. (2014): The role of fibroblast growth factor 21 in the pathogenesis of liver disease: a novel predictor and therapeutic target. In: *Expert opinion on therapeutic targets*, S. 1–9.
- L llmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Martineau, Y.; Le Bec, C.; Monbrun, L.; Allo, V.; Chiu, I. M.; Danos, O. et al. (2004): Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. In: *Molecular and cellular biology* 24 (17), S. 7622–7635.

- Martling, C. R.; Matran, R.; Alving, K.; Hökfelt, T.; Lundberg, J. M. (1990): Innervation of lower airways and neuropeptide effects on bronchial and vascular tone in the pig. In: *Cell and tissue research* 260 (2), S. 223–233.
- McMillan, S. J.; Lloyd, C. M. (2004): Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling. In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34 (3), S. 497–507.
- McNeil, P. L.; Muthukrishnan, L.; Warder, E.; D'Amore, P. A. (1989): Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. In: *The journal of cell biology* 109 (2), S. 811–822.
- Meisinger, C.; Grothe, C. (1997): Differential regulation of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 mRNAs and FGF-2 isoforms in spinal ganglia and sciatic nerve after peripheral nerve lesion. In: *Journal of neurochemistry* 68 (3), S. 1150–1158.
- Mignatti, P.; Morimoto, T.; Rifkin, D. B. (1992): Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. In: *Journal of cellular physiology* 151 (1), S. 81–93.
- Mortola, J.; Sant'Ambrogio, G.; Clement, M. G. (1975): Localization of irritant receptors in the airways of the dog. In: *Respiration Physiology* 24 (1), S. 107–114.
- Mulder, D. J.; Pacheco, I.; Hurlbut, D. J.; Mak, N.; Furuta, G. T.; MacLeod, R. J.; Justinich, C. J. (2009): FGF9-induced proliferative response to eosinophilic inflammation in oesophagitis. In: *Gut* 58 (2), S. 166–173.
- Murphy, K. R.; Marsh, W. R.; Glezen, L. S.; Irvin, C. G.; Wilson, M. C.; Larsen, G. L. (1986): Inflammation and the late phase reaction in asthma: the effect of polymorphonuclear leukocyte depletion on airways obstruction and bronchial hyperreactivity in an animal model. In: *Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire* 22 (7), S. 48–53.
- Nassenstein, C.; Braun, A.; Erpenbeck, V. J.; Lommatzsch, M.; Schmidt, S.; Krug, N. et al. (2003): The neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 are survival and activation factors for eosinophils in patients with allergic bronchial asthma. In: *The journal of experimental medicine* 198 (3), S. 455–467.
- Nassenstein, C.; Dawbarn, D.; Pollock, K.; Allen, S. J.; Erpenbeck, V. J.; Spies, E. et al. (2006a): Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. In: *The journal of allergy and clinical immunology* 118 (3), S. 597–605.
- Nassenstein, C.; Dawbarn, D.; Pollock, K.; Allen, S. J.; Erpenbeck, V. J.; Spies, E. et al. (2006b): Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 118 (3), S. 597–605.
- Nassenstein, C.; Kammertoens, T.; Veres, T. Z.; Uckert, W.; Spies, E.; Fuchs, B. et al. (2007): Neuroimmune crosstalk in asthma: dual role of the neurotrophin receptor p75NTR. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 120 (5), S. 1089–1096.
- Nassenstein, C.; Taylor-Clark, TE.; Myers, A.C.; Ru, F.; Nandigama, R.; Bettner, W.; Udem, BJ. (2010): Phenotypic distinctions between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. In: *The Journal of Physiology* 588 (23), S. 4769–4783.

- Nawa, H.; Pelleymounter, M. A.; Carnahan, J. (1994): Intraventricular administration of BDNF increases neuropeptide expression in newborn rat brain. In: *The journal of neuroscience: The official journal of the Society for Neuroscience* 14 (6), S. 3751–3765.
- O'Byrne, P. M.; Dolovich, J.; Hargreave, F. E. (1987): Late asthmatic responses. In: *The American review of respiratory disease* 136 (3), S. 740–751.
- Oellig, C.; Pirvola, U.; Taylor, L.; Elde, R.; Hökfelt, T.; Pettersson, R. F. (1995): Acidic FGF and FGF receptors are specifically expressed in neurons of developing and adult rat dorsal root ganglia. In: *The European journal of neuroscience* 7 (5), S. 863–874.
- Ogawa, H.; Azuma, M.; Uehara, H.; Takahashi, T.; Nishioka, Y.; Sone, S.; Izumi, K. (2012): Nerve growth factor derived from bronchial epithelium after chronic mite antigen exposure contributes to airway hyperresponsiveness by inducing hyperinnervation, and is inhibited by in vivo siRNA. In: *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 42 (3), S. 460–470.
- Ohgino, K.; Soejima, K.; Yasuda, H.; Hayashi, Y.; Hamamoto, J.; Naoki, K. et al. (2014): Expression of fibroblast growth factor 9 is associated with poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer. In: *Lung Cancer* 83 (1), S. 90–96.
- Ornitz, D. M.; Itoh, N. (2001): Fibroblast growth factors. In: *Genome Biology* 3 (2), S. 3005.1-3005.12.
- Ornitz, D. M.; Xu, J.; Colvin, J. S.; McEwen, D. G.; MacArthur, C. A.; Coulier, F. et al. (1996): Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family 271 (25), S. 15292–15297.
- Parish, C. R. (2006): The role of heparan sulphate in inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (9), S. 633–643.
- Pasumarthi, K.B.S.; Jin, Y.; Bock, M. E.; Lytras, A.; Vet Kardami E.; Cattini A.P. (1995): Characterization of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 RNA Expression in the Embryonic Mouse Heart. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 752, S. 406–416.
- Pavelka, M.; Ronge, H. R.; Stockinger, G. (1976): Comparative study of tracheal epithelium of different mammals. In: *Acta anatomica* 94 (2), S. 262–282.
- Plopper, C. G.; Hill, L. H.; Mariassy, A. T. (1980): Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung. III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. In: *Experimental lung research* 1 (2), S. 1971–1980.
- Plotnikov, A. N.; Schlessinger, J.; Hubbard, S. R.; Mohammadi, M. (1999): Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. In: *Cell* 98 (5), S. 641–650.
- Politis, M. J. (1986): Retina-derived growth-promoting extract supports axonal regeneration in vivo. In: *Brain research* 364 (2), S. 369–371.
- Rajah, R.; Nachajon, R. V.; Collins, M. H.; Hakonarson, H.; Grunstein, M. M.; Cohen, P. (1999): Elevated levels of the IGF-binding protein protease MMP-1 in asthmatic airway smooth muscle. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20 (2), S. 199–208.
- Ravenhall, C.; Guida, E.; Harris, T.; Koutsoubos, V.; Stewart, A. (2000): The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in

- human cultured airway smooth muscle. In: *British journal of pharmacology* 131 (1), S. 17–28.
- Redington, A. E.; Roche, W. R.; Madden, J.; Frew, A. J.; Djukanovic, R.; Holgate, S. T.; Howarth, P. H. (2001): Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge. In: *The journal of allergy and clinical immunology* 107 (2), S. 384–387.
- Riccio, M. M.; Myers, A. C.; Udem, B. J. (1996): Immunomodulation of afferent neurons in guinea-pig isolated airway. In: *The Journal of Physiology* 491 (Pt 2), S. 499–509.
- Ritz, T.; Steptoe, A.; Bobb, C.; Harris, A. H.; Edwards, M. (2006): The asthma trigger inventory: validation of a questionnaire for perceived triggers of asthma. In: *Psychosomatic medicine* 68 (6), S. 956–965.
- Roche, W. R.; Beasley, R.; Williams, J. H.; Holgate, S. T. (1989): Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. In: *Lancet* 1 (8637), S. 520–524.
- Rock, J. R.; Randell, S. H.; Hogan, B. L. (2010): Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. In: *Disease, models & mechanisms* 9-10 (3), S. 545–556.
- Saetta, M.; Turato, G. (2001): Airway pathology in asthma. In: *European Respiratory Journal* 18 (1), S. 18–23.
- Sahni, A.; Francis, C. W. (2004): Stimulation of endothelial cell proliferation by FGF-2 in the presence of fibrinogen requires $\alpha v \beta 3$. In: *Blood* 104 (12), S. 3635–3641.
- Sannes, P. L.; Wang, J. (1997): Basement membranes and pulmonary development. In: *Experimental lung research* 23 (2), S. 101–108.
- Santiago, J. J.; McNaughton, L. J.; Koleini, N.; MA, X.; Bestvater, B.; Nickel, B. E. et al. (2014): High molecular weight fibroblast growth factor-2 in the human heart is a potential target for prevention of cardiac remodeling. In: *PLoS ONE* 9 (5).
- Sautter, N. B.; Delaney, K. L.; Hausman, F. A.; Trune, D. R. (2012): Tissue remodeling gene expression in a murine model of chronic rhinosinusitis. In: *The Laryngoscope* 122 (4), S. 711–717.
- Sautter, N. B.; Delaney, K. L.; Trune, D. R. (2011): Altered expression of tissue remodeling genes in a mouse model of acute allergic rhinitis. In: *International forum of allergy & rhinology* 1 (4), S. 262–267.
- Scarce-Levie, K.; Roberson, E. D.; Gerstein, H.; Cholfin, J. A.; Mandiyan, V. S.; Shah, N. M. et al. (2008): Abnormal social behaviors in mice lacking Fgf17. In: *Genes, brain and behavior* 7 (3), S. 344–354.
- Schlessinger, J. (2000): Cell signaling by receptor tyrosin kinases. In: *Cell Press* 103, S. 211–225.
- Schmidt, R. F.; Lang, F. (2007): Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 30. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Schuliga, M.; Javeed, A.; Harris, T.; Xia, Y.; Qin, C.; Wang, Z. et al. (2013): Transforming growth factor- β -induced differentiation of airway smooth muscle cells is inhibited by fibroblast growth factor-2. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 48 (3), S. 346–353.

- Shimada, T.; Kakitani, M.; Yamazaki, Y.; Hasegawa, H.; Takeuchi, Y.; Fujita, T. et al. (2004): Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. In: *The journal of clinical investigations* 113 (4), S. 561–568.
- Shute, J. K.; Solic, N.; Shimizu, J.; McConnell, W.; Redington, A. E.; Howarth, P. H. (2004): Epithelial expression and release of FGF-2 from heparan sulphate binding sites in bronchial tissue in asthma. In: *Thorax* 59 (7), S. 557–562.
- Sørensen, V.; Nilsen, T.; Wiedłocha, A. (2006): Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. In: *BioEssays* 28 (5), S. 504–514.
- Spolcová, A.; Holubová, M.; Mikulášková, B.; Nagelová, V.; Stofková, A.; Lacinová, Z. et al. (2014): Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes. In: *Physiological research*.
- Swert, K. O. de; Joos, G. F. (2006): Extending the understanding of sensory neuropeptides. In: *European Journal of pharmacology* 533 (1-3), S. 171–178.
- Taylor-Clark, T. E.; Nassenstein, C.; McAlexander, M. A.; Udem, B. J. (2009): TRPA1: a potential target for anti-tussive therapy. In: *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2 (22), S. 71–74.
- Taylor-Clark, T. E.; Udem, B. J. (2010): Ozone activates airway nerves via the selective stimulation of TRPA1 ion channels. In: *The Journal of Physiology* 588 (Pt 3), S. 423–433.
- Terada, M.; Kelly, E. A.; Jarjour, N. N. (2004): Increased thrombin activity after allergen challenge: a potential link to airway remodeling? In: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169 (3), S. 373–377.
- Thompson, S. R. (2012): Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. In: *Trends in microbiology* 20 (11), S. 558–566.
- Touriol, C.; Morillon, A.; Gensac, M. C.; Prats, H.; Prats, A. C. (1999): Expression of human fibroblast growth factor 2 mRNA is post-transcriptionally controlled by a unique destabilizing element present in the 3'-untranslated region between alternative polyadenylation sites. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (30), S. 21402–21408.
- Tränkner, D.; Hahne, N.; Sugino, K.; Hoon, M. A.; Zuker, C. (2014): Population of sensory neurons essential for asthmatic hyperreactivity of inflamed airways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (31), S. 11515–11520.
- Trevisani, M.; Siemens, J.; Materazzi, S.; Bautista, D. M.; Nassini, R.; Campi, B. et al. (2014): 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (33), S. 13519–13524.
- Udem, B. J.; Carr, M. J. (2002): The role of nerves in asthma. In: *Current allergy and asthma reports* 2 (2), S. 159–165. Review.
- Udem, B. J.; Nassenstein, C. (2009): Airway nerves and dyspnea associated with inflammatory airway disease. In: *Respiratory physiology and neurobiology* 167 (1), S. 36–44. Review.

- Usui, H.; Shibayama, M.; Ohbayashi, N.; Konishi, M.; Takada, S.; Itoh, N. (2004): Fgf18 is required for embryonic lung alveolar development. In: *Biochemical and biophysical research communication* 322 (3), S. 887–892.
- Vagner, S.; Gensac, M. C.; Maret, A.; Bayard, F.; Amalric, F.; Prats, H.; Prats, A. C. (1995): Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. In: *Molecular and cellular biology* 15 (1), S. 35–44.
- Verleden, G. M. (1996): Neural mechanisms and axon reflexes in asthma. Where are we? In: *Biochemical pharmacology* 51 (10), S. 1247–1257.
- Vermeer, P. D.; Harson, R.; Einwalter, L.A.; Moninger, T.; Zabner, J. (2003): Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 28 (3), S. 286–295.
- Vijayaraghavan, R.; Schaper, M.; Thompson, R.; Stock, M. F.; Boylstein, L. A.; Lou, J. E.; Alarie, V. (1994): Computer assisted recognition and quantitation of the effects of airborne chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice. In: *Archives of Toxicology* 68 (8), S. 490–499.
- Watanabe, N.; Horie, S.; Michael, G.J.; Spina, D.; Page, C.P.; Priestley, J.V. (2005): Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. In: *Pulmonary pharmacology and therapeutics* 18 (3), S: 187-197
- Werner, S.; Duan, D. S.; Vries, C. de; Peters, K.G.; Johnson, D.E.; Williams, L. T. (1992): Differential splicing in the extracellular region of fibroblast growth factor receptor 1 generates receptor variants with different ligand-binding specificities. In: *Molecular and cellular biology* 12 (1), S. 82–88.
- Wesseling-Perry, K.; Wang, H.; Elashoff, R.; Gales, B.; Jüppner, H.; Salusky, I. B. (2014): Lack of FGF23 response to acute changes in serum calcium and PTH in humans. In: *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 99 (10), E1951-E1956
- Widdicombe, J. G. (1954): The site of pulmonary stretch receptors in the cat. In: *The Journal of Physiology* 125 (2), S. 336–351.
- Widdicombe, J.G. (1982): Pulmonary and respiratory tract receptors. In: *The Journal of experimental biology* 100, S. 41-57
- Widdicombe, J. G. (2003): Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). In: *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular and evolutionary biology* 270 (1), S. 2–10.
- Xiao, L.; Du, Y.; Shen, Y.; He, Y.; Zhao, H.; Li, Z. (2012): TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway. In: *Frontiers in bioscience* 17, S. 2667–2674.
- Yan, G.; Fukabori, Y.; McBride, G.; Nikolaropolous, S.; McKeehan, W. L. (1993): Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. In: *Mechanism of development* 13 (8), S. 4513–4522.
- Yarden, Y.; Ullrich, A. (1988): Growth factor receptor tyrosine kinases. In: *Annual review of biochemistry* 57, S. 443–478.

- Yoshida, K.; Gage, F. H. (1991): Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. In: *Brain research* 538 (1), S. 118–126.
- Zanni, G.; Barresi, S.; Travaglini, L.; Bernardini, L.; Rizza, T.; Digilio, M. C. et al. (2011): FGF17, a gene involved in cerebellar development, is downregulated in a patient with Dandy-Walker malformation carrying a de novo 8p deletion. In: *Neurogenetics* 12 (3), S. 241–245.
- Zhang, X.; Ibrahimi, O. A.; Olsen, S. K.; Umemori, H.; Mohammadi, M.; Ornitz, D. M. (2006): Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family: The complete mammalian FGF family. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (23), S. 15694–15700.
- Zou, H.; Nie, X. H.; Zhang, Y.; Hu, M.; Zhang, Y. A. (2008): Effect of basic fibroblast growth factor on the proliferation, migration and phenotypic modulation of airway smooth muscle cells. In: *Chinese medical journal* 121 (5), S. 424–429.

9. Anhang

Gen	Primer	Sequenz (5' zu 3')	GenBank	Länge	Annealing Temp.	MgCl ₂
β-Aktin	Sense	gtgggaatgggtcagaagg Start: 212	NM_007393	302 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	gaggcatacagggacagca Start: 513				
TRPV1	Sense	gctgctaacgggacttctt Start: 691	NM_001001445	285 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	cttcagtgtgggtggagtt Start: 975				
P2X2	Sense	ggggcagtgtagtcagcatc Start: 570	NM_153400	241 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	tcagaagtcccatcctcca Start: 810				
FGFR1	Sense	cgaggtgaacgggagtaaga Start: 1625	NM_010206.2	164 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	cgatagagttacccgccaag Start: 1788				
FGFR2	Sense	agagcgatgtctgtccttc Start: 3272	NM_201601.2	212 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	caactgcttgaatgtgggtct Start: 3483				
FGFR3	Sense	tacggggtggtcttcttct Start: 1425	NM_008010.4	179 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	acaaggggtgtgttgagtt Start: 1603				
FGFR4	Sense	cgaggtgtccgtctctct Start: 1452	NM_008011.2	228 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	ggtgtgtccagtaggggtgct Start: 1680				
FGFR1 IIIb- Variante	Sense	cgaggtgaacgggagtaaga Start: 663	AF176552	190 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	gacagtgagccacgcagac Start: 852	Sequenzierung			

FGFR1 IIIc- Variante	Sense	accaccgacaaggaaatgg Start:1692	NM_001079908. 1	124 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	gaacggcaaccatgcaga Start:1815				
D3	Sense	gagaataagcttgggagcatca accacacctaccagc	(Pasumarthi et al. 1995), (Jin et al. 1994)	790 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	ccgctcccgaagagccccctt aagacaac				
FGF1	Sense	gatgggacaaggacagga Start: 326	NM_010197.3	311 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	agggcagaacaagatgg Start: 636				
FGF2	Sense	ccaagcagaagagagaggag tt Sart: 386	NM_008006.2	237 bp	60°C	2,5mM
	Antisense	tgtccaggtcccgtttgt Start: 622				
FGF5	Sense	tgtctcaggggattgtaggaa Start: 599	NM_010203.4	275 bp	62°C	1,5 mM
	Antisense	gggtaggaagtgggtggag Start:873				
FGF6	Sense	gtagaacgggtgtggtgag Start:411	NM_010204.1	255 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	cctggggaggaagtgagtg Start: 665				
FGF8	Sense	gcatgaacaagaagggaag Start: 685	NM_010205.2	271 bp	62°C	2,5 mM
	Antisense	aaggcggttagttgagg Start: 955				
FGF9	Sense	gttgggagctatttcggtgt Start: 389	NM_013518.4	297 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	gaccaggcccactgctatac Start: 685				
FGF13	Sense	gggtggtgctattcaagg Start: 702	NM_010200.2	310 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	gtgagatcgtgcagagatgg Start: 1011				

FGF16	Sense	ggaatgaatgagcgaggaga Start: 410	NM_030614.2	250 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	tggagggcaacttagaagga Start: 640				
FGF17	Sense	ggcaaatccgtgaataccag Start:660	NM_008004.4	271 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	gccgtgtagttgttccagt Start: 930				
FGF18	Sense	acctgtgtatgaaccgaaagg Start:455	NM_008005.1	271 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	cgcttggtgactgtggtgt Start: 725				
FGF20	Sense	gggatgaatgacaaaggagaa cStart: 604	NM_030610.2	253 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	ctgggtctactggtcttggtaaa Start: 838				
FGF21	Sense	cgcagtccagaaagtctcct Start: 410	NM_020013.4	177 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	attgtaaccgtcctccagca Start: 586				
FGF22	Sense	ctcacttttctcgcgtgtg Start: 119	NM_023304.1	243 bp	60°C	2,5 mM
	Antisense	gcgaggcgtatgtgttag Start: 361				
FGF23	Sense	tggtgataacaggagccatg Start: 376	NM_022657.3	376 bp	62°C	1,5 mM
	Antisense	gagcaggatacaggcacagg Start: 748				

Tab. 9.1: Sequenzen der verwendeten Primer und PCR-Bedingungen

10. Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation

R. Böhmer, R. Nandigama, S. Wiegand, W. Kummer, C. Nassenstein
(2011) Fibroblast Growth Factors (FGFs) sind neue Kandidaten für die Regulation sensorischer C-Faser-Neurone in murinen Atemwegen.
28. Arbeitstagung der anatomischen Gesellschaft, Würzburg

R. Böhmer, R. Nandigama, S. Wiegand, J. Lee, W. Kummer, C. Nassenstein
(2012) Bronchopulmonary C-fiber activation in allergic asthma: Novel evidence for an involvement of the FGF/FGFR1 IIIc-system.
LOEWE-Zentrum UGMLC Lungenerkrankungen: Reparatur, Remodelling und Regeneration, Marburg

J. Lee, R. Böhmer, R. Nandigama, S. Wiegand, W. Kummer, C. Nassenstein
(2013) Bronchopulmonary C-fiber activation in allergic asthma: The function of FGFR1 and its ligands.
3. DZL Annual Meeting, Heidelberg

J. Lee, R. Böhmer, R. Nandigama, S. Wiegand, W. Kummer, C. Nassenstein
(2013) Bronchopulmonary C-fiber activation in allergic asthma: The function of FGFR1 and its ligands.
8. Kongress der International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN) und 15. Treffen der European Federation of Autonomic Societies (EFAS), Giessen

11. 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 wissenschaftliche Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles von anderen Quellen oder anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen den
Rebecca Böhmer

12. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Dr. Christina Nassenstein für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung meiner Arbeit.

Liebe Christina, danke für deine Geduld, dein Vertrauen und deinen Optimismus. Du hast mir jeder Zeit in allen Fragen zur Seite gestanden und mir immer wieder Mut zugesprochen wenn es mal nicht so gut lief. Dafür gilt dir ein großes Dankeschön.

Ein ganz besonderer Dank geht an die liebe Silke, für all deine Unterstützung im Labor, die mühsamen Einarbeitungen in die verschiedensten Methoden und deine Excel-Kenntnisse aber insbesondere dafür, dass wir darüber hinaus so viel Spaß miteinander hatten und ich dich sehr lieb gewonnen habe.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch dem Rest der AG Pandastein, vor allem dir Rajender, für die schöne, lustige Zeit danken.

Auch meine Mitdoktoranden haben ein großes Dankeschön verdient. Ihr habt immer für gute Laune gesorgt und wir hatten den ein oder anderen lustigen Ausflug miteinander;-).

Dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Kardiopulmonale Neurobiologie, möchte ich für eure Hilfsbereitschaft und Unterstützung Danken.

Liebe Annette, liebe Maike. Wir haben dieselben Probleme geteilt und die Hürde gemeinsam genommen. Danke für den Austausch, die gegenseitige Unterstützung, dafür, dass ich mich von euch immer verstanden gefühlt habe.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden die mich in allen Belangen unterstützt und mir diese Arbeit erst ermöglicht haben; die vielen aufbauenden Gespräche. Liebe Mama, Papa, Bär, Kira, Peter, Paula und liebe Melanie, Annette, Maike und Karo danke für eure Hilfe.