

Aus dem Charité Centrum für Innere Medizin mit Kardiologie,  
Gastroenterologie, Nephrologie  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie  
Direktor: Prof. Dr. Dietz

Habilitationsschrift

**Effekte pro-inflammatorischer peptiderger Mediatoren auf die  
Pathophysiologie entzündlicher Atemwegserkrankungen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach

Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Herrn Dr. rer. nat. Jochen Springer**

**geboren am 21. März 1971 in Norden**

eingereicht:

Dekanin: Prof. Dr. Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Ewert

2. Prof. Dr. H. Fehrenbach

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Neurogene Entzündung der Atemwege	2
1.2.	Peptiderge Mediatoren des NANC-Systems	5
1.2.1.	Anti-inflammatorische peptiderge Mediatoren	5
1.2.2.	Pro-inflammatorische peptiderge Mediatoren	5
1.2.3.	Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)	5
1.2.4.	Tachykinine	7
1.2.4.1.	Tachykinin-Rezeptoren	8
1.2.4.2.	Tachykinin-Abbau	9
1.2.4.3.	Modulation der Tachykinin-Expression	9
1.3.	Fragestellung	11
<b>2.</b>	<b>Veröffentlichungen zum Thema der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift</b>	<b>12</b>
2.1.	Effects of alpha-calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery.	12
2.2.	NK1 receptor stimulation causes contraction and inositol phosphate increase in isolated medium size human bronchi.	22
2.3.	Alternative splicing in single cells dissected from complex tissues: separate expression of prepro-tachykinin A mRNA-splice variants in sensory neurones.	29
2.4.	Fischer. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis.	38
2.5.	Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species.	46
2.6.	Neurokinin-1 receptor activation induces reactive oxygen species and epithelial damage in allergic airway inflammation.	52
2.7.	SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke.	64

2.8.	Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury.	71
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
3.1.	Expression von CGRP und Tachykininen	82
3.2.	Pharmakologische Effekte von CGRP und Tachykininen in der Lunge	83
3.3.	Rolle von Tachykininen bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen der Lunge	85
3.4.	Mögliche Bedeutung der Substanz P-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies	89
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>109</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

AP-1	Activator Protein 1
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BrdU	Bromodesoxyuridin
CGRP	Calcitonin Gene Related Protein
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CSE	Zigarettenrauchextrakt
DCF(DA)	Di-Chloro-Fluorescein- (Di-Azetat)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NAC	N-Acetylcystein
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NANC	Nicht-adrenerges, nicht-cholineres (Nervensystem)
NEB	Neuroepithelial Bodies
NEP	Neutrale Endopeptidase
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NGF	Nerve Growth Factor
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NK1/2/3	Neurokinin-1/2/3 Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
PPT-A	Präpro-Tachykinin-A
PPT-B	Präpro-Tachykinin-B
RAMP	Receptor Activity-Modifying Protein
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SMAD	Gruppe von Transkriptionsfaktoren, deren Name sich aus den Drosophila Protein Mothers Against Decapentaplegic und dem C. elegans Protein SMA zusammensetzt

SP	Substanz P
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor- $\beta$ 1
TRPV-1	Transient Receptor Potential Vanilloid-1 (Rezeptor)
TrkA/B/C	Rezeptor Tyrosin Kinase A/B/C
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **1. Einleitung**

Durch die Interaktion zwischen einem Organismus und seiner Umwelt kommt es zu einem ständigen Kontakt zu chemischen, physikalischen und mikrobiellen Noxen, die dem Körper unterschiedlich starke Schädigungen zufügen können. Für den Kontakt spielen neben der Haut und dem gastrointestinalen System die Atemwege aufgrund ihrer großen Oberfläche eine entscheidende Rolle. Um diese Noxen abzuwehren, bedient sich der menschliche Körper einer Reihe von komplex zusammenwirkenden Systemen, die letztlich eine zielgerichtete Immunantwort möglich machen und zu einer Entzündungsreaktion führen. Stellt diese primär einen wichtigen Abwehrmechanismus dar, welcher zur Lebenserhaltung dient, so kann es durch eine chronische Reaktion oder eine Überreaktion auf harmlose Stimuli zu einem schädigen Effekt auf körpereigenes Gewebe kommen. Als sozioökonomisch bedeutsame Beispiele seien hier für eine chronische Reaktion die chronische obstruktive Atemwegserkrankung (COPD) und für die Überempfindlichkeit das allergische Asthma bronchiale genannt.

Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor), Hitzeempfinden (Calor) und Schmerz (Dolor) sind die klassischen Anzeichen einer Entzündung. Diese Entzündungsmerkmale sind bei Verletzung oder Erkrankung der Haut offensichtlich, während sie in den Atemwegen schlechter, weil indirekter, zu erfassen sind. In den Atemwegen kommt es zu einer Vasodilatation und einer Kongestion der Gefäße, die von einer Rötung der Atemwegsmukosa und Plasmaexsudation begleitet werden. Dies führt zu einem Anschwellen der Atemwegswand. Ähnlich wie bei der Haut, aber schwächer ausgeprägt, tritt auch in den Atemwegen eine Schmerzreaktion auf, die sich als Beklemmungsgefühl äußert.

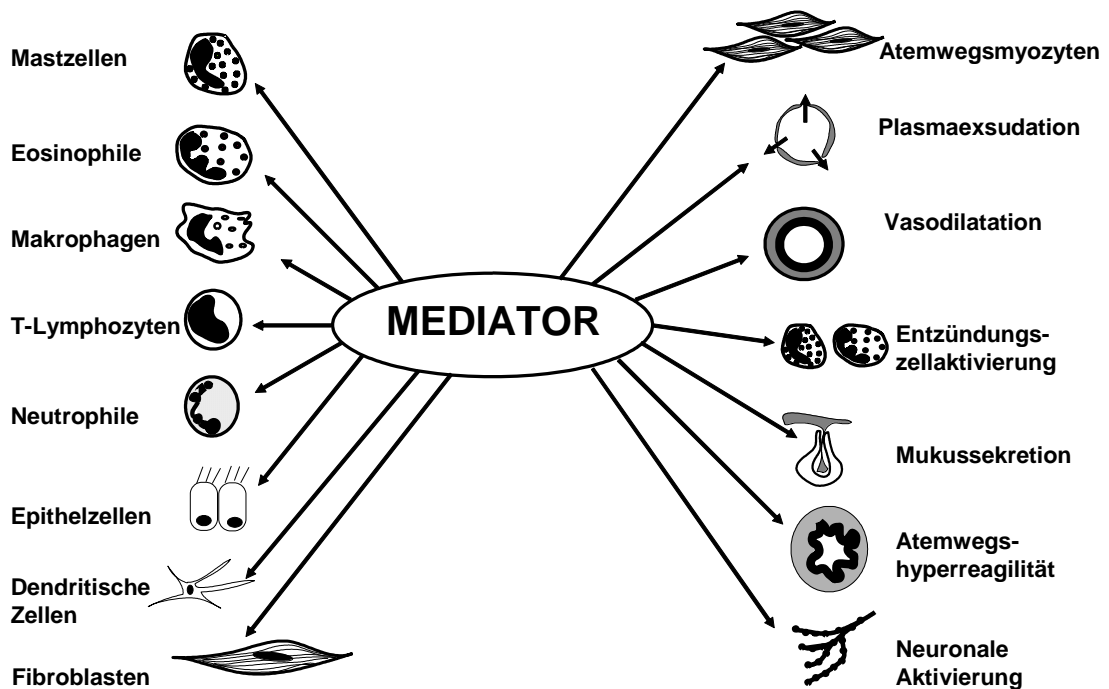
Die Regulation der Immunantwort wird durch zelluläre, humorale und auch nervale Einflüsse gesteuert. Eine große Anzahl Studien belegen eine wesentliche Bedeutung zellulärer und humoraler Bestandteile des Immunsystems bei der Entstehung und Progression pathophysiologischer Veränderungen der Atemwege. Dabei kommt dem autonomen Nervensystem eine modulierende Wirkung zu. Die Aktivierung peripherer afferenter Nervenendigungen kann zu einer lokalen Sekretion verschiedener Mediatoren

führen, deren lokale Wirkung in der Peripherie eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie und Pathobiochemie vieler entzündlicher Erkrankungen spielt. Jansco et al. [1] prägten 1967 für diese entzündungsregulierende Wirkung der peripher freigesetzten Mediatoren den Begriff der „neurogenen Entzündung“.

### **1.1. Neurogene Entzündung der Atemwege**

Astma bronchiale wird als eine klassische inflammatorische Erkrankung der Atemwege angesehen, die sich durch eine Infiltration von aktivierten Mastzellen, gewebständigen Makrophagen, eosinophilen- und in einigen Fällen neutrophilen Granulozyten in die Submukosa und Adventitia sowohl der großen, als auch der kleinen Atemwege darstellt [2]. Ein zweites wichtiges Charakteristikum des Asthmas ist die Schädigung des Bronchialepithels, die von einer verstärkten Ablagerung von interstitiellem Collagen, Laminin und Tenascin unterhalb der eigentlichen Basalmembran begleitet wird. Das Epithel selbst nimmt einen „Reparatur-Phänotyp“ an; es kommt zur Metaplasie der Zellen und einer vermehrten Bildung von Becherzellen. Ein drittes pathophysiologisch wichtiges Merkmal von chronischem Asthma ist eine Hyperplasie aller Strukturen der Atemwege, unter anderem der Kapillaren, der glatten Muskulatur und der afferenten Neurone [3]. Diese strukturellen Veränderungen hypersensibilisieren das gesamte System „Atemwege“.

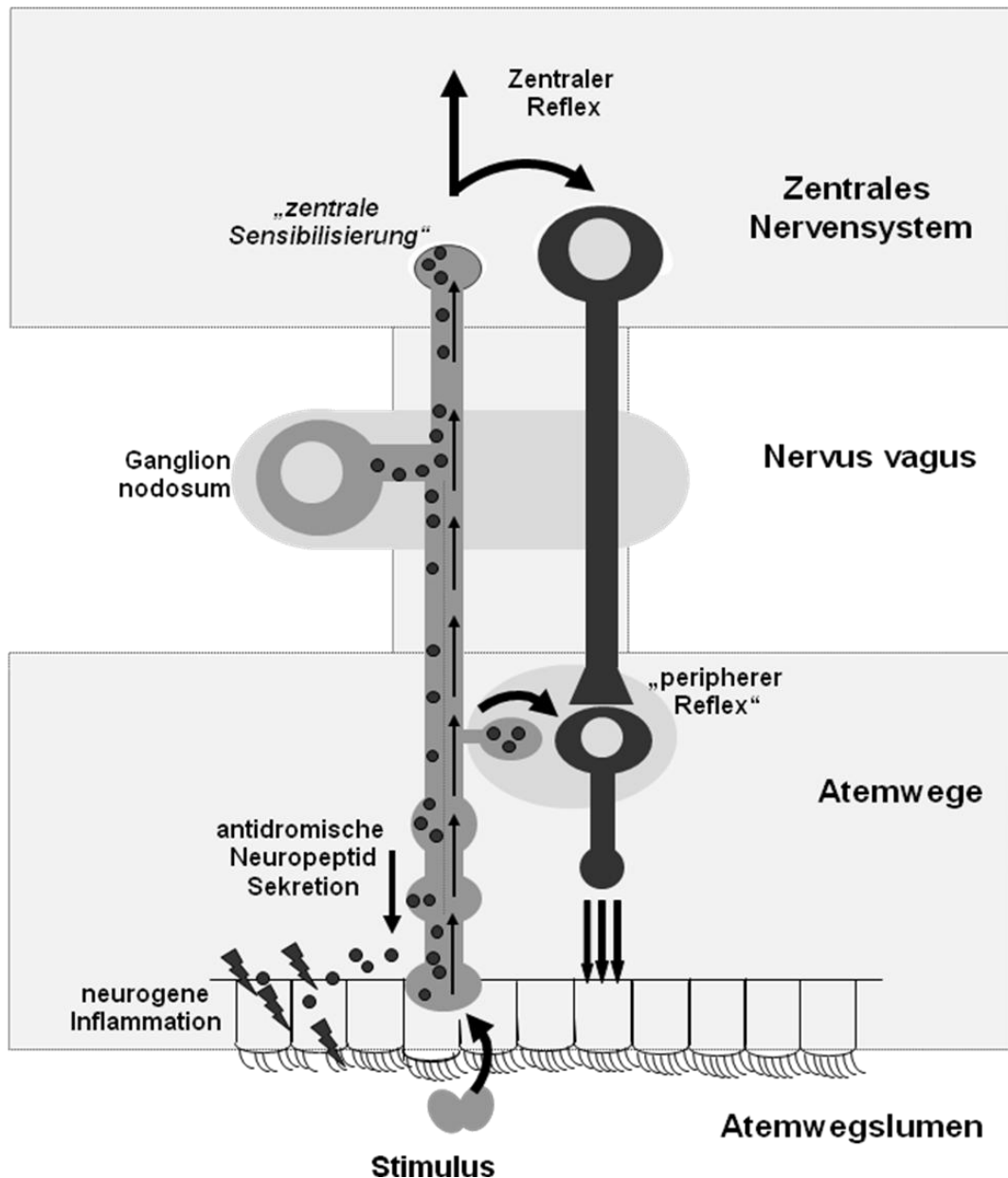
Die den entzündlichen Veränderungen zugrunde liegenden Mechanismen werden von einer Vielzahl an Mediatoren beeinflusst, die Effekte auf verschiedenste pulmonale Funktionen haben (Abbildung 1) [4].



**Abbildung 1:** Wirkungsort pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren in den Atemwegen.

Zu diesen Mediatoren gehört neben den klassischen Entzündungsparametern wie den Zytokinen [4] auch eine als neurogene Entzündung beschriebene Komponente, bei der es zu einer lokalen Sekretion von peptidergen Mediatoren aus afferenten Neuronen kommt (Abbildung 2) und die bei der Ausbildung der klassischen Entzündungsmerkmale *Calor*, *Rubor* und *Dolor* beteiligt sind [5]. Diese Neuropeptide gehören keinem morphologisch eingrenzbaeren Nervensystem innerhalb der Atemwege an; die Effekte dieser Mediatoren werden deshalb als nicht-adrenerges, nicht-cholinerges (NANC)-System zusammengefasst und dessen Mediatoren in zwei funktionell divergente Gruppen des exzitatorischen NANC-Systems (e-NANC) und des inhibitorischen NANC-Systems (i-NANC) eingeordnet [6].





**Abbildung 2:** Konzept der neurogenen Entzündung der Atemwege. Nach peripherer Stimulation von sensiblen Nervenfasern durch Noxen wie Allergenen oder Rauch kommt es zu einer Aktivierung von sensiblen Nervenfasern. Das Signal wird klassischerweise orthodrom zum Hirnstamm weitergeleitet. Dort wird das eingehende Signal moduliert und auf efferente parasympathische Neurone übertragen, die in lokalen Atemwegsganglien parasympathische Effekte induzieren. Gleichzeitig kommt es zu einer Induktion der proinflammatorischen Neuropeptid-Expression in den sensiblen Ganglien. Diese Neuropeptide werden dann antidrom zu den peripheren Endigungen der sensiblen Neuronen transportiert und lokal freigesetzt, wo sie eine neurogene Entzündung auslösen (nach Groneberg 2004 [7]).

## **1.2. Peptiderge Mediatoren des NANC-Systems**

### **1.2.1. Anti-inflammatorische peptiderge Mediatoren**

Neben den pro-inflammatorischen Neuropeptiden des eNANC-Systems gibt es eine relativ inhomogene Gruppe von anti-inflammatorischen Neuropeptiden und Mediatoren des i-NANC Systems, die die Stärke der neurogenen Inflammation beeinflussen können. Zu diesen gehören Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) [8], Neuropeptid Y (NPY) [9], das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) [10] und auch endogene Opiode [11].

### **1.2.2. Pro-inflammatorische peptiderge Mediatoren**

Zu den pro-inflammatorischen e-NANC Mediatoren gehört neben Bradykinin [12] und Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) [13] auch die Familie der Tachykinine [14].

In den vorliegenden Arbeiten wurden insbesondere die Effekte der oft kolokalisierten Mediatoren CGRP und der Gruppe der Tachykinine auf pathophysiologische und pathobiochemische Prozesse untersucht, weshalb deren Strukturen und Funktionen an dieser Stelle genauer erläutert werden.

### **1.2.3. Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP)**

CGRP besteht aus 37 Aminosäuren und ist das Produkt alternativen Splicings des Calcitonin Gens [15]. CGRP ist oft mit der Familie der Tachykinine in sensiblen Nervenfasern kolokalisiert, welche die oberen und unteren Atemwege zahlreicher Spezies innervieren [16, 17]. Darüber hinaus ist die Expression von CGRP sowohl auf der mRNA, als auch auf der Protein-Ebene in pulmonalen neuroendokrinen Zellen gezeigt worden, die zum Teil in Clustern, den Neuroepithelial Bodies (NEB), organisiert sind. Diese CGRP-haltigen Zellen finden sich in allen Abschnitten des Respirationstrakts bis hin zu den Alveolen [18, 19] und bilden ein wichtiges Reservoir für epitheliale Progenitorzellen [20]. CGRP bindet an für Neuropeptide typische, 7-transmembran G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivität von einer Familie von Receptor Activity-

Modifying Proteins (RAMP) reguliert wird und die man daher als Typ I oder Typ II CGRP Rezeptoren unterscheidet [21]. Bindungsstellen für CGRP in der Lunge wurden autoradiographisch in pulmonalen und bronchialen Gefäßen aller Größen sowie in den Alveolarwänden gezeigt [22]. Dagegen zeigte die glatte Muskulatur sowie das Epithel nur wenige und die submukosalen Drüsen keine Bindungsstellen für CGRP [22].

In-vitro Studien an humanen Bronchien zeigten, dass CGRP konstriktorisch auf die glatte Muskulatur der Atemwege wirkt [17]. Zwei mögliche Mechanismen wurden diskutiert, entweder aktiviert CGRP die Phospholipase C und führt so über  $IP_3$  zur Konstriktion [23] oder CGRP führt zur Sekretion anderer konstriktorischer Mediatoren. Für letztere Hypothese würde die geringe Dichte an autoradiographisch dargestellten Bindungsstellen in der Atemwegsmuskulatur sprechen. Im Respirationstrakt des Meerschweinchens konnte keine einheitliche konstriktorische oder dilatorische Wirkung von CGRP gezeigt werden, so dass der jeweilige Effekt eine Addition der Wirkungen von Mediatoren mit entgegengesetzten Wirkungen darstellt [24]. Dieses Szenario wird durch den Phänotyp-Switch hin zum inflammatorischen Phänotyp weiter kompliziert. Bei Verletzungen des Atemwegsepithels durch inflammatorische Prozesse spielen die NEBs eine wichtige Rolle, da CGRP einerseits für die Re-Epithelialisierung [20] wichtig ist und andererseits das Einwandern von Fibroblasten sowie deren Proliferation stimulieren kann [25]. Auf die Sekretion von Mukus scheint CGRP keinen Einfluss zu haben [26]. Dagegen ist es als einer der stärksten bekannten Vasodilatoren [27], dessen Rezeptoren sich hochexprimiert in den bronchialen Gefäßen finden [28], an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt. Im Gegensatz zu Substanz P führt CGRP aber nicht zu einer Plasmaexsudation [29].

CGRP kann durch mehrere, in (humanen) Atemwegen exprimierte Enzyme mittels proteolytischer Spaltung inaktiviert werden. Dabei kommt der neutralen Endopeptidase (NEP) die größte Bedeutung zu. Pharmakologische Inhibition dieser Peptidase führte zu einer Verstärkung von CGRP-Effekten in den Atemwegen [30].

#### 1.2.4. Tachykinine

Die Tachykinine bilden eine Familie von Neuropeptiden, deren ältester Vertreter das 1931 durch von Euler und Gaddum beschriebene Substanz P (SP) ist [31], welches erst 1971 sequenziert wurde [32, 33]. Nach der Sequenzierung weiterer Tachykinine zeigte sich, dass diese Neuropeptide alle durch die C-terminale Aminosäuresequenz Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (X= variable Aminosäure) gekennzeichnet sind [34, 35]. Die variable Aminosäure ist dabei entweder eine aromatische oder eine  $\beta$ -verzweigte aliphatische Aminosäure.

Kodiert werden die zur Tachykinin-Familie gehörenden Peptide von zwei Genen, PPT-A und PPT-B, heute auch TAC1 und TAC3 genannt [36]. Das PPT-A Gen kodiert für die Mediatoren Substanz P, Neurokinin A, sowie Neuropeptid K und Neuropeptid- $\gamma$ , welche durch alternatives Splicing der Exone 4 und 6 der PPT-A mRNA ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  PPT-A) entstehen [37]. Alle 4 Splice-Varianten kodieren für Substanz P, zusätzlich kodiert die  $\beta$ -Form für NKA und für eine N-terminal verlängerte Version von NKA, das Neuropeptid K. Die  $\gamma$ -Form kodiert ebenfalls für ein N-terminal verlängertes NKA, das Neuropeptid- $\gamma$  [38, 39]. Es treten deutliche, spezies-abhängige Unterschiede in der Häufigkeit der Expression der 4 Splice-Varianten auf. So wird beim Mensch vorrangig  $\beta$ -PPT-A exprimiert, während bei der Ratte die  $\gamma$ -Variante vorherrscht [40]. Ein weiterer Vertreter der Tachykinin-Familie ist das in den Atemwegen bisher nicht nachgewiesene Neurokinin B (NKB), welches durch das PPT-B-Gen kodiert wird [41, 34].

Substanz P und Neurokinin A werden als Mediatoren von einer Subgruppe Atemweg-projizierender sensibler Neurone exprimiert, von denen sie nach Exposition mit Irritantien, wie Allergenen, Rauch und Capsaicin, oder endogenen Mediatoren, wie Bradykinin, Prostaglandinen, Histamin oder Protonen freigesetzt werden [34]. Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass diese Nervenfasern jedes Kompartiment der unteren Atemwege mit Ausnahme der Knorpelspangen von Tachykinin-haltigen Axonen erreichen [42, 43]. Der Ursprung der tachykinergen Neurone der Atemwege und ihres Gefäßbetts liegt in vagalen Ganglien (*Ganglion nodosum* und *Ganglion jugulare*) und den oberen thorakalen Spinalganglien [44, 45].

Eine non-neuronale Tachykinin-Synthese in eosinophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen wurde diskutiert [14]. Die Wirkungen der pro-inflammatorischen Tachykinine auf die Atemwege und die pulmonale Strombahn wird über verschiedene Tachykinin-Rezeptoren induziert [34, 46].

#### **1.2.4.1. Tachykinin-Rezeptoren**

Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der einzelnen Tachykinine zu deren Rezeptoren lassen sich diese pharmakologisch differenzieren. Bei den drei Tachykinin-Rezeptoren handelt es sich um eine Gruppe Gq-Protein gekoppelter Rezeptoren, die einen IP<sub>3</sub>-vermittelten Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegels durch die Phospholipase C bewirken und nach Agonisten-Bindung eine Desensibilisierung zeigen [47]. Bei höheren Agonisten-Konzentrationen kommt es auch zur Bildung von cAMP [14]. Die Rezeptoren sind auf drei Genen kodiert, die wahrscheinlich durch Duplikationsereignisse eines ancestralen Gens entstanden sind [47]. Sie enthalten für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unübliche Introns in den Protein-kodierenden Regionen [48, 49]. Tachykinine weisen zwar eine hohe Sequenzhomologie in ihrem carboxyterminalen Ende auf, durch die die Aktivierung des entsprechenden Rezeptors stattfindet [50, 51], jedoch unterscheiden sie sich an ihren aminoterminalen Enden, durch die ihre Affinität zu den unterschiedlichen Rezeptoren definiert wird.

Substanz P zeigt die größte Affinität zum Neurokinin 1 (NK-1) Rezeptor. Neurokinin A und die verlängerten Formen von Neurokinin A, Neuropeptid K [38] und Neuropeptid- $\gamma$  [39] aktivieren hauptsächlich den NK-2 Rezeptor. Die NK-3 Rezeptoren zeigen die höchste Affinität zu Neurokinin B. In hohen Konzentrationen ist jedoch jedes Mitglied der Tachykinin-Familie in der Lage die nicht präferierten Rezeptoren zu aktivieren, so dass das System eine hohe funktionelle Plastizität aufweist [34]. Die Rezeptoren für Tachykinine wurden in der Lunge in den Bereichen von Tracheal- und Bronchialmyozyten, Drüsen, im respiratorischen Epithel und in Lamina propria-Zellen, sowie Gefäßmyozyten und dem Endothel nachgewiesen [52]. Neben den NK-1 und NK-2 Rezeptoren [53] wurde auch die Expression des NK-3 Rezeptors diskutiert, welcher vorrangig im ZNS beschrieben wurde [37, 54]. Pharmakologische Daten lassen

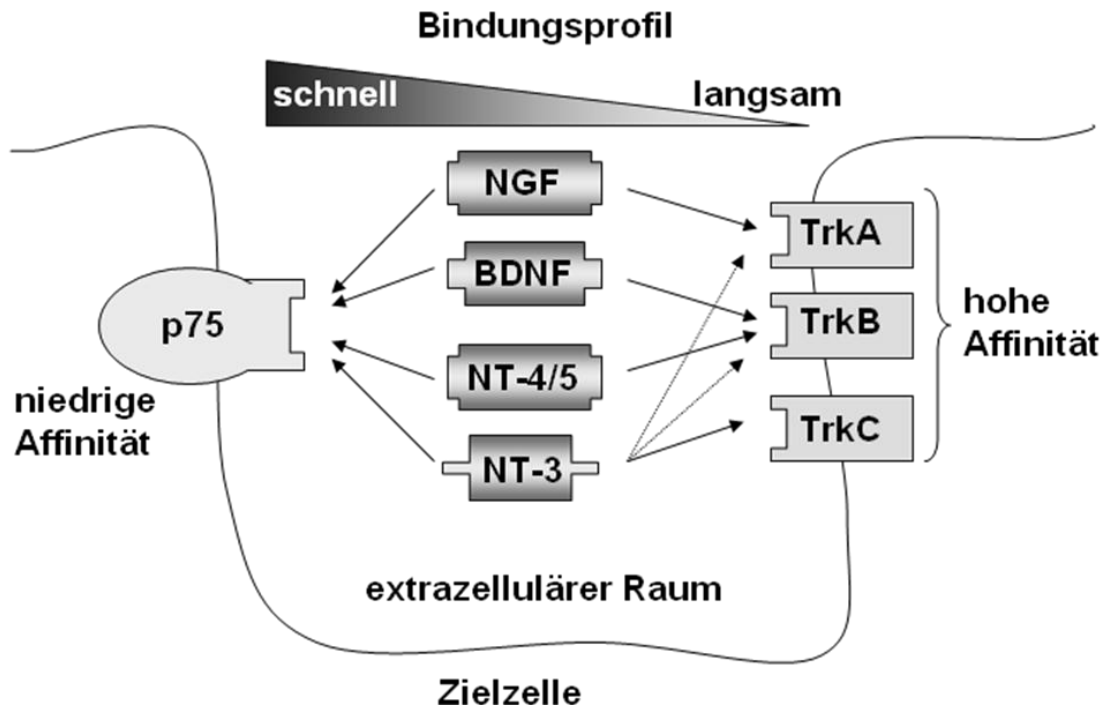
vermuten, dass der NK-3 Rezeptor zumindest bei Meerschweinchen in den Bronchialganglien exprimiert wird [55, 56]. Dagegen ist das Vorkommen von Neurokinin B, das hochaffine Tachykinin des NK-3 Rezeptors, in der Lunge nicht gezeigt worden [57, 34].

#### **1.2.4.2. Abbau von Tachykininen**

Neben der Desensibilisierung der jeweiligen Rezeptoren werden die Effekte von Tachykininen auch durch den enzymatischen Abbau reguliert. Wie auch CGRP werden Tachykinine hauptsächlich durch die Neutrale Endopeptidase (NEP) abgebaut [58], die die Peptide an mehreren Stellen schneidet [59]. Neben der NEP können weitere im Plasma vorhandene Peptidasen, wie das Angiotensin Converting Enzym [60, 59], die Plasma-Dipeptidyl(amino)peptidase IV und das Post-Proline-Cleaving-Enzyme [61] Tachykinine abbauen.

#### **1.2.4.3. Modulation der Tachykinin-Expression**

Die Expression von Neuropeptiden wie den Tachykininen und CGRP unterliegt einer strengen Kontrolle und wird durch zahlreiche Mediatoren moduliert. Die wichtigste Gruppe dieser Mediatoren bilden die Neurotrophine, die während der Embryonalphase für das Einwachsen von Nervenfasern in periphere Gewebe und später für das Überleben von Neuronen adulter Tiere verantwortlich sind. Die Gruppe der Neurotrophine wird von BDNF, NGF, NT-3 und NT4/5 gebildet, die mit den hochaffinen Rezeptoren TrkA, Trk-B und Trk-C, sowie dem pan-Rezeptor p75 interagieren (Abbildung 3) [62, 63].



**Abbildung 3:** Bindungsprofil der neurotrophen Faktoren.

Bei Asthmatikern wurden erhöhte Serum NGF-Spiegel festgestellt [64]. Applikation von exogenem NGF führt ebenfalls zu einer Induktion der Tachykinin-Synthese [65]. Die erhöhten Tachykinin-Spiegel entstehen möglicherweise durch eine de-novo Expression von Tachykininen in mechanorezeptiven Neuronen [66, 67].

### 1.3. Fragestellung und Ziel

Nach dem Kenntnisstand zu Beginn der experimentellen Untersuchungen der vorliegenden kumulativen Arbeit war bekannt, dass Neuropeptide, wie die Familie der Tachykinine und CGRP, im Rahmen der Pathophysiologie und Pathobiochemie eine Vielzahl von allergischen Erkrankungen [68, 69, 70] regulieren und in der Peripherie freigesetzt werden.

Es war jedoch nicht geklärt, inwieweit diese Neuropeptide selbst an den Remodelling Prozessen der Atemwege beteiligt sind oder ob sie indirekt durch die erhöhte Permeabilität der bronchialen Gefäße und die dadurch resultierende Infiltration von inflammatorischen Zellen an diesem Geschehen beteiligt sind. Unter der Annahme, dass pro-inflammatorische Neuropeptide direkte Effekte auf die Pathophysiologie von chronischen Atemwegserkrankungen haben, bestand die Zielstellung der Arbeit darin, am Beispiel von Tachykininen und CGRP, zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Rolle von peptidergen Entzündungsmediatoren zu gelangen.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Wo sind diese Neuropeptide exprimiert und gibt es nicht-neuronale Quellen in der humanen Lunge?
2. Sind Tachykinine und CGRP nur Marker für eine gesteigerte Atemwegssensibilität oder stehen sie in einem kausalen Zusammenhang mit der Pathophysiologie chronischer Atemwegserkrankungen?
3. Welcher Mechanismus könnte für die schädigende Wirkung von Tachykininen verantwortlich sein?
4. Treten diese Effekte, z.B. die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, speziell in den Atemwegen auf oder könnte dies ein genereller Mechanismus sein?



## **2. Veröffentlichungen zum Thema der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift**

### **2.1. Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery**

Jochen Springer, Silvia Amadesi, Marcello Trevisani, Selena Harrison, Q. Thai Dinh, Gerald P. McGregor, Axel Fischer, Pierangelo Geppetti, David A. Groneberg

Der Tonus von Atemwegen und den pulmonalen Gefäßen wird vorherrschend von cholinergen und adrenergen Impulsen reguliert. Die Regulation des Tonus von humaner glatter Muskulatur wird von biologisch aktiven Peptiden wie Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen signifikant beeinflusst. In dieser Studie wurden die Expression von CGRP und seinem Rezeptor CGPR-1, sowie deren biologischen Effekte in humanen Atemwegen und pulmonalen Gefäßen untersucht. Immunhistochemisch wurde CGRP in neuroepithelialen Bodies (NEB) und Atemwegs-projizierenden Neuronen nachgewiesen. Der Rezeptor fand sich in Epithelzellen, der glatten Muskulatur der Atemwege und dem Endothel der pulmonalen Gefäße. Vorkontrahierte Bronchien (Durchmesser 3-4 mm) zeigten eine Dosis-abhängige Kontraktion nach der Entfernung des Epithels, wohingegen es bei einem intakten Epithel zu keinerlei Effekten kam. In pulmonalen Arterien (2-6 mm Durchmesser) führte die Applikation von CGRP zu einer Dosis-abhängigen Vasodilatation, die sowohl bei intaktem, als auch bei entferntem Endothel auftrat. Prä-Inkubation mit Indomethacin, aber nicht mit L-NAME, inhibierte die CGRP-induzierte Relaxation der Gefäße. Dies lässt darauf schließen, dass Prostaglandine aber nicht Stickstoffmonoxid (NO) an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind. Die Effekte von CGRP auf Bronchien und Arterien konnten mit dem spezifischen Antagonisten CGRP<sub>(8-37)</sub> inhibiert werden. Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass die Effekte von

CGRP sich bei intaktem Bronchialepithel gegenseitig aufheben, es aber bei Epithelschäden, die bei pathologischen Vorgängen wie z.B. bei Asthma oder COPD auftreten, zu einer Kontraktion der Atemwege kommt. Gleichzeitig kommt es zu einer Dilatation der Gefäße, was in den Bronchien ein weiteres Anschwellen begünstigt.

### **Referenz**

J. Springer, S. Amadesi, M. Trevisani, S. Harrison, Q. T. Dinh, G. P. McGregor, A. Fischer, P. Geppetti, D. A. Groneberg. Effects of alpha-calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. Regul. Pept. May 15; 118(3): 127-34

## **2.2. NK-1 Receptor Stimulation Causes Contraction and Inositol Phosphate Increase in Medium-size Human Isolated Bronchi**

Silvia Amadesi, Joelle Moreau, Michele Tognetto, Jochen Springer, Marcello Trevisani, Emmanuel Naline, Charles Advenier, Axel Fischer, Damiano Vinci, Christina Mapp, Deborak Miotto, Giorgio Cavallesco, Pierangelo Geppetti

Obwohl die Kontraktion isolierter humaner Bronchien hauptsächlich durch NK-2 Rezeptoren vermittelt wird, kommt es nach der Stimulierung von NK-1 Rezeptoren in kleinen humanen Bronchien mit einem Durchmesser von ca. 1 mm über die Sekretion von Prostanoiden zu einer Kontraktion. In dieser Studie wurde die Expression des NK-1 Rezeptors und dessen vermittelte Effekte in mittleren humanen Bronchien mit einem Durchmesser von 2-5 mm untersucht. Mittels Immunhistochemie wurde der NK-1 Rezeptor in glatten Muskelzellen der Bronchien lokalisiert. Applikation des selektiven NK-1 Rezeptor Agonisten [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP führte in ca. 60% der isolierten Bronchien zu einer Kontraktion. Dieser Effekt wurde durch zwei verschiedene NK-1 Rezeptor Antagonisten, CP 99994 und SR140333, reduziert. Die durch [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP induzierte Kontraktion war unabhängig von Acetylcholin- oder Histamin-Sekretion, einem intakten Epithel und wurde nicht durch eine Inhibition der NO-Synthase und Cyclooxygenase beeinflusst. [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP erhöhte die Inositolphosphat Level, was durch SR 140333 in kleinen und mittleren Bronchien inhibiert wurde. Eine Inhibition der Cyclooxygenase verhinderte eine [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP-vermittelte Bildung von Inositolphosphat in kleinen, nicht aber in mittleren Bronchien.

Aktivierung von NK-1 Rezeptoren führte zu einer Bronchokonstriktion in einem großen Teil der untersuchten humanen Bronchien. Anders als in kleinen Bronchien ist dieser Effekt unabhängig von einer Sekretion von Prostanoiden und die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass Substanz P direkt über den NK-1 Rezeptor via den Inositolphosphat Signalweg auf glatte Muskelzellen der Bronchialwand wirkt.

## **Referenz**

S. Adamesi, E. Naline, M. Tognetto, J. Springer, M. Trevisani, C. Advenier, A. Fischer, D.Vinci, C. Mapp, D. Miotto, G. Cavallesco, P. Geppetti. NK1 receptor stimulation causes contraction and inositol phosphate increase in isolated medium size human bronchi. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 163: 1206-1211 (2001)

### **2.3. Alternative splicing in single cells dissected from complex tissues: separate expression of prepro-tachykinin A mRNA splice variants in sensory neurons.**

Jochen Springer, Gerard P McGregor, Ludger Fink, Axel Fischer

Tachykinine spielen bei peripheren inflammatorischen Erkrankungen und bei zentralnervösen Störungen eine pathophysiologisch wichtige Rolle. Die meisten Mitglieder der Tachykinin-Familie werden durch post-transkriptionales alternatives Splicing der Exone 4 und 6 des Präpro-Tachykinin-A Gens (PPT-A) generiert. Während alle Splice Varianten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) Substanz P bilden können, kann Neurokinin A nur von  $\beta$ - und  $\gamma$ -PPT-A, sowie Neuropeptid K und Neuropeptid- $\gamma$  jeweils nur von  $\beta$ - oder  $\gamma$ -PPT-A gebildet werden. In der vorliegenden Studie ist die Expression der PPT-A Splice Varianten in individuellen Neuronen des Ganglion nodosum untersucht worden. In mRNA-Extrakten ganzer Ganglien wurde sowohl die Expression aller vier alternativen mRNA Transkripte mittels RT-PCR gezeigt, als auch das Vorkommen aller darin kodierten Tachykinine. Die Peptide wurden durch eine HPLC fraktioniert und anschließend die Tachykinin-Peptide dieser Fraktionen mittels Radioimmunoassay bestimmt. Um die PPT-A Expression in individuellen Neuronen zu untersuchen, wurden einzelne kleine Neurone aus kurz Hämatoxylin-gefärbten Kryoschnitten des Ganglions mittels Laser Mikrodissektion aus dem Gewebeverband isoliert und diese dann direkt für die RT-PCR verwendet.

Von den untersuchten Neuronen exprimierten 31.9% ein spezifisches PPT-A Transkript. Auf individueller Basis zeigte sich jedoch, dass ein einzelnes Neuron immer nur eine der vier möglichen Splice-Varianten exprimierte. Dabei war  $\alpha$ -PPT-A die häufigste exprimierte mRNA. Dies war zu dem Zeitpunkt der Fertigstellung die erste Studie, die die PPT-A Expression auf Einzelzellebene untersucht hat. Zieht man die große Zahl an alternativ gesplitten Genen des (humanen) Genoms in Betracht und die daraus resultierenden tiefeschürfenden physiologischen Effekte, so zeigt sich, dass die hier verwendete Methode ein großes Potential hat, um einzelne Zellen aus einem Gewebeverband zu

isolieren und zu untersuchen, ohne dabei die durch zellulären Stress bedingten Veränderungen von enzymatisch dissoziierten neuronalen Zellen in Kauf nehmen zu müssen.

Für das PPT-A Gen selbst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass alternatives post-transkriptionales Splicing den tachykinergen Phänotyp individueller Neurone festlegt und so wichtige funktionelle Implikationen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen hat. Besonders deshalb, weil durch ein Umstellen der Zelle auf eine andere Splice Variante die in der Peripherie auftretenden Effekte wie Vasokonstriktion durch Neurokinin A in eine gegenteilige Reaktion wie Vasodilatation durch Substanz P verwandeln können.

### **Referenz**

J. Springer, G. P. McGregor, L. Fink, A. Fischer. Alternative splicing in single cells dissected from complex tissues: separate expression of prepro-tachykinin A mRNA-splice variants in sensory neurones. *J Neurochem.* May;85(4):882-888 (2003)

## **2.4. Inflammatory cells as a source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis**

Jochen Springer, David A. Groneberg, Reinhard Pregla, Axel Fischer

Substanz P und Neurokinin A sind regulatorische Peptide, die zur Familie der Tachykinine gehören und die einen weitreichenden Einfluss auf die Funktion humaner Atemwege unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen wie Asthma und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) haben. Die Tachykinin-induzierte Sekretion von Mukus wurde bisher als abhängig von sensiblen Neuronen angesehen. In dieser Studie wurde das Vorkommen von Tachykinin-mRNA und Tachykinin-Peptiden und deren Bezug zu NK-1 Rezeptor positiven Zellen der humanen Schleimdrüsen in mittelgroßen Bronchien untersucht, um festzustellen, ob Tachykinine auch von inflammatorischen Zellen in den Schleimdrüsen gebildet werden können. Mittels RT-PCR wurde die Expression von Tachykinin-mRNA in humanen Atemwegen gezeigt. Ein Präpro-Tachykinin-A (PPT-A) Signal wurde in inflammatorischen Zellen mittels in-situ Hybridisierung gefunden. Dieses Signal wurde mittels Immunhistochemie validiert, wobei hier nicht zwischen den einzelnen Tachykinin-Peptiden unterschieden werden konnte, da der eingesetzte Antikörper gegen das gemeinsame N-terminale Ende der Zellen gerichtet war. Die Tachykinin-positiven Zellen befanden sich nahe bzw. an den myoepithelialen Zellen der Schleimdrüsen, die ihrerseits eine Immunoreaktivität für den NK-1 Rezeptor aufwiesen.

Diese Daten zeigen, dass inflammatorische Zellen, die positiv für PPT-A mRNA und Tachykinin-Peptide sind, in direktem Kontakt zu dem NK-1 Rezeptor positiven Myoepithel der Schleimdrüsen stehen. Dies lässt vermuten, dass es nicht nur zu einer Regulation der Schleimsekretion durch neuronal freigesetzte Tachykinine kommt, sondern unter pathophysiologischen Bedingungen chronischer Atemwegserkrankungen, wie bei Asthma und COPD, auch von inflammatorischen Zellen freigesetzte Tachykinine eine Rolle spielen können.

## **Referenz**

J. Springer, D. A. Groneberg, R. Pregla, A. Fischer. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. Regul Pept. Jan 15;124(1-3):195-201 (2005)



## **2.5. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species**

Jochen Springer, Dirk Pleimes, Frank R. Scholz, Axel Fischer

Ein charakteristisches Merkmal bei asthmatischen Patienten ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und die Aktivierung des AP-1 Transkriptionsfaktors während der inflammatorischen Prozesse. Die Induktion von AP-1 führt zu einer erhöhten Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen. Gleichzeitig sind erhöhte Substanz P (SP) Spiegel in bronchoalveolären Lavage Flüssigkeiten von Asthmatikern beschrieben worden. In dieser Arbeit ist die Rolle von Substanz P auf die Bildung von ROS und die nachfolgende Aktivierung von AP-1 in A 549 Atemwegsepithelzellen untersucht worden. Dazu wurde die Bildung von ROS mittels der Dichlorofluorescein-Diacetate Methode untersucht, die Aktivierung von AP-1 mittels Reportergen Assays. Es hat sich gezeigt, dass die SP-medierte Induktion von AP-1 abhängig von extrazellulären Kalzium und ROS ist. Die wahrscheinliche Quelle der ROS sind die Mitochondrien, da Rotenone die Induktion von AP-1 inhibierte und die mRNA für die p47phox Untereinheit des NADPH Oxidase Komplexes, welcher für die Bildung von ROS in phagozytotischen Zellen verantwortlich ist, nicht in A549 Zellen exprimiert war. Auch in Zellen des bronchialen Atemwegsepithels, die mittels Laser Capture Microdissection aus murinen Atemwegen isoliert wurden, konnte keine Expression von p47phox nachgewiesen werden. Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass SP in der Lage ist ROS-abhängig AP-1 zu indizieren, was zur Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen beitragen könnte.

### **Referenz**

J. Springer, D. Pleimes, F. R. Scholz, A. Fischer. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. Regul Pept. Jan 15;124(1-3):99-103 (2005)

## **2.6. Neukinin-1 Rezeptor Aktivierung induziert reaktive Sauerstoffspezies und Epitheliale Schädigung in allergischer Atemwegs Entzündung**

Jochen Springer, David A. Groneberg, Q. Thai Dinh, David Quarcoo, Eckart Hamelmann, Rüdiger C. Braun-Dullaeus, Pierangelo Geppetti, Stefan D. Anker, Axel Fischer

Eine Induktion der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist charakteristisch für eine Entzündungsreaktion. Bei allergischem Asthma sind erhöhte ROS-Level in der ausgeatmeten Luft von Asthmatikern beschrieben worden. Die genauen Bildungsorte und die Signaltransduktionswege waren bisher nicht bekannt. Ziel dieser Studie war es, die Rolle des Tachykinin NK-1 Rezeptors im Zusammenhang mit der Bildung von ROS, der akuten Inflammation nach der Allergen-Challenge und den sich anschließenden pathophysiologisch bedeutsamen Umbauprozessen der Atemwegswand zu bestimmen. Dazu wurden vitale Lungenschnitte aus den Lungen von Ovalbumin (OVA) sensitivierten Tieren angefertigt und diese Schnitte kultiviert. Die Bildung von ROS wurde mittels der 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetate (DCF) Methode nach in-vitro Allergen-Challenge mit 10 µg/ml OVA über den Zeitraum einer Stunde untersucht. Langzeit-Effekte der ROS auf die epitheliale Proliferation wurden mittels Inkorporation von 5-Bromo-2'-Deoxyuridine über einen Zeitraum von 72 Stunden charakterisiert. Die Bildung von ROS war im Epithel von sensibilisierten, OVA-geschalligten Tieren 3,7-fach erhöht, was durch die Applikation des Tachykinin NK-1 Rezeptor Antagonisten SR 140333 vollständig inhibiert werden konnte. Das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC), welches als Radikalfänger funktioniert, war ebenfalls in der Lage das DCF-Signal vollständig zu reduzieren. Inkubation der vitalen Lungenschnitte mit 5nM [Sar<sup>9</sup>, Met<sup>11</sup>(O<sub>2</sub>)]-Substanz P verursachte ebenfalls eine vierfach erhöhte, NK-1 Rezeptor-abhängige Bildung von ROS. Eine Inkubation der Lungenschnitte mit 5nM [Sar<sup>9</sup>, Met<sup>11</sup>(O<sub>2</sub>)]-Substanz P, als Modell einer chronisch erhöhten Sekretion von Substanz P über einen Zeitraum von 72 Stunden, resultierte in einer um 68% reduzierten Proliferationsrate.

Die Ergebnisse dieser Studien wurden mittels in-vivo Versuchen an OVA-sensibilisierten Tieren validiert, bei denen die Tiere intranasal vor der allergen-

Challenge entweder mit Placebo, SR 140333 oder NAC behandelt wurden. Die inflammatorische Infiltration und das Remodelling wurden 48 Stunden nach Allergen-Challenge untersucht. Dabei zeigte sich eine Reduktion des Epithelschadens durch SR 140333 um 91,4% und durch NAC um 76,8% gegenüber der Placebo behandelten Gruppe ( $p < 0.0001$  für beide Behandlungen). Die Hyperplasie der Schleimbecherzellen des Epithels wurde durch die Behandlung um 67,4% (SR 140333) und 50,1% (NAC) gesenkt ( $p < 0.05$ ). Auch der Influx inflammatorischer Zellen wurde durch die Therapie gesenkt (65,3% und 45,3% gegenüber Placebo,  $p < 0.01$ ). Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Allergen-Challenge die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Abhängigkeit des Tachykinin NK-1 Rezeptors induziert. Die Inhibition dieses Rezeptors in-vivo reduzierte die Schädigung des Bronchialepithels und die Remodelling-Prozesse deutlich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Asthma-Patienten möglicherweise von einem Therapie-Regime, das Antioxidantien oder Antagonisten des NK-1 Rezeptors beinhaltet, profitieren könnten.

## **Referenz**

J. Springer, D.A. Groneberg, Q.T. Dinh, D. Quarcoo, E. Hamelmann, R.C. Braun-Dullaeus, P. Geppetti, S.D. Anker, A. Fischer. Neurokinin-1 receptor activation induces reactive oxygen species and epithelial damage in allergic airway inflammation. Clin Exp Allergy. Dec;37(12):1788-97 (2007)

## **2.7. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke**

Jochen Springer, Frank R. Scholz, Christian Peiser, David A. Groneberg, Axel Fischer

Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 ist bei chronisch obstruktiver Atemwegserkrankung (COPD) an den Umbauprozessen der Atemwegswand beteiligt. Es ist durch die Stimulation der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen ein potenter Modulator der zu beobachtenden Fibrosierung. Signale der TGF-Superfamilie werden direkt durch die Gruppe der SMAD Transkriptionsfaktoren intrazellulär verarbeitet. In dieser Studie ist die mRNA Expression der regulatorischen SMAD-2 und -3, des SMAD-4, welches für die Translokation der SMAD-Heterodimere wichtig ist, sowie der inhibitorischen SMAD-6 und -7, welche das Signal der TGF-Superfamilien negativ regulieren, in Bronchialbiopsien von COPD-Patienten und gesunden Kontrollen mittels quantitativer RT-PCR untersucht worden. Während eine Expression von SMAD-2 nicht gezeigt werden konnte, war die Expression von SMAD-3 und SMAD-4 gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Dagegen zeigten die inhibitorischen SMAD-6 und -7 eine starke Reduktion der Expression gegenüber den Kontrollen. In Zellkulturversuchen mit der epithelialen Zelllinie A549 wurde der Effekt des Kondensats aus dem Zigarettenrauch auf die Expression von SMAD-6 und -7 untersucht. Dazu wurden die konfluenten Zellen mit 1% oder 10 % Zigarettenrauchextrakt über 48 Stunden inkubiert. Wiederum zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression der inhibitorischen SMADs.

Man kann also davon ausgehen, dass die TGF- $\beta$  medierte Effekte auf das Remodelling in den Atemwegen bei COPD-Patienten durch einen gestörten intrazellulären negativen Feedback-Mechanismus unterstützt bzw. verursacht werden. Dazu gehört, dass der nicht flüchtige Teil des Zigarettenrauchs, das Kondensat, eine wichtige Rolle bei dem Remodelling zu haben scheint und

alleine für die reduzierte Expression der inhibitorischen SMADs verantwortlich zu sein scheint.

### **Referenz**

J. Springer, F. R. Scholz, C. Peiser, D. A. Groneberg, A. Fischer. SMAD-signaling in chronic obstructive pulmonary disease: transcriptional down-regulation of inhibitory SMAD 6 and 7 by cigarette smoke. *Biol. Chem.* 385(7): 649-53 (2004)

## **2.8. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produce reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury**

David Gazzieri\*, Marcello Trevisani\*, Jochen Springer\*, Selena Harrison, Graeme S. Cottrell, Eunce Andre, Paola Nicoletti, Daniela Massi, Sandra Zecchi, Daniele Nosi, Marco Santucci, Norma P. Gerad, Monica Lucattelli, Guiseppe Lungarella, Axel Fischer, Eileen F. Grady, Nigel W. Bunnet, Pierangelo Geppetti

\*= equal contribution

Obwohl bekannt war, dass Neurokinin-1 Rezeptor Antagonisten Ethanol-induzierte gastrische Läsionen verhindern können, war bisher nicht bekannt, über welchen Mechanismus es zur Sekretion von Substanz P kommt und über welche Mechanismen Substanz P die Mukosa des Magens schädigt. Die unserer Arbeit zugrunde liegende Hypothese war, dass Ethanol den Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) auf den Endigungen sensibler Neuronen aktiviert, wodurch es zur Sekretion von Substanz P kommt. Dieses wiederum stimuliert epitheliale Neurokinin-1 Rezeptoren, was zu einer schädigenden Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Substanz P Sekretion wurde im Magen der Maus gemessen, die Bildung von ROS wurde mittels der 2',7'-Dichlorofourescein-Diacetate (DCF) Methode untersucht und das Vorhandensein von Neurokinin-1 Rezeptoren wurde mit immunhistochemischen Methoden gezeigt. Die Sekretion von Substanz P durch Ethanol wurde durch den Antagonismus des TRPV1 Rezeptors verhindert. Hochdosiertes Ethanol verursachte Läsionen in der Mukosa und die pharmakologische Inhibition des TRPV1 oder Neurokinin-1 Rezeptors, sowie der Knock-Out des Neurokinin-1 Rezeptors, verhinderte die Bildung von Läsionen. Ko-Applikation von niedrig dosiertem und damit unschädlichem Ethanol und Substanz P führte zu einer TRPV1 unabhängigen, aber Neurokinin-1 Rezeptor abhängigen Bildung von Läsionen. Ethanol, Capsaicin und Substanz P stimulierte die Bildung von ROS in oberflächlichen Epithelzellen des Magens, die den Neurokinin-1 Rezeptor exprimierten. Die Applikation von Antioxidantien bzw. Radikalfängern verhinderte die Bildung von

Läsionen bei Tieren, denen entweder hochdosiertes Ethanol oder eine Kombination aus niedrigdosiertem Ethanol und Substanz P verabreicht wurde. Läsionen der Magenschleimhaut werden durch einen Effekt des Ethanols verursacht, der nur dann zu Schädigungen führt, wenn er mit der Aktivierung des TRPV1 Rezeptors, der Sekretion von Substanz P aus sensiblen Neuronen, der Stimulation des Neurokinin-1 Rezeptors und der Bildung von ROS assoziiert ist.

### **Referenz**

D. Gazzieri\*, M. Trevisani\*, J. Springer\*, S. Harrison, G.S. Cottrell, E. Andre, P. Nicoletti, D. Massi, S. Zecchi, D. Nosi, M. Santucci, N.P. Gerard, M. Lucattelli, G Lungarella, A. Fischer, E.F. Grady, N.W. Bunnett, P. Geppetti. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radic Biol Med.* Aug 15;43(4):581-9. (2007)

### **3. Diskussion**

#### **3.1. Expression von CGRP und Tachykininen**

Mittels retrogradem neuronalen Tracings wurde gezeigt, dass ein großer Teil der tachykinergen Innervation der Maus aus dem Komplex aus dem *Ganglion jugulare* und *Ganglion nodosum* entstammt [71]. Eine Induktion der Tachykinin-Expression durch die Überexpression des neurotrophen Faktors BDNF ist in diesem Komplex gezeigt worden [72]. Auch Nerve Growth Factor [71] und Stress [73] induzieren die Tachykinin-Expression in den beiden Ganglien. Die Untersuchung der PPT-A mRNA Expression in diesem Komplex zeigte das Vorhandensein von allen 4 Splice-Varianten, wobei der Anteil der zufällig gewählten und analysierten Neurone, deren mRNA ( $\alpha$ - und  $\delta$ -PPT-A) nur die Synthese von Substanz P zulässt, deutlich höher war als die der Neurone, deren PPT-A mRNA eine Synthese von Substanz P und/oder NKA und dessen verlängerten Versionen NPK und NP $\gamma$  ermöglicht [74]. Im Gegensatz dazu wurde beim Mensch hauptsächlich  $\beta$ -PPT-A und bei der Ratte hauptsächlich  $\gamma$ -PPT-A gefunden [40], so dass die Expression von Tachykininen sehr speziesabhängig zu sein scheint. Das bei der Maus gezeigte Expressionsmuster hat in peripheren Geweben, wie der Lunge eine Relevanz, da Substanz P und NKA physiologisch an unterschiedliche Rezeptoren binden und komplementäre Effekte induzieren können.

Darüber hinaus konnte in der humanen Lunge gezeigt werden, dass bei COPD-Patienten inflammatorische Zellen, die sich an oder in den subepithelialen Schleimdrüsen befinden, PPT-A mRNA exprimieren und die Zellen positiv für Tachykinin-Immunoreaktivität sind. Diese Zellen könnten aktiv an der Regulation der Schleimsekretion beteiligt sein [75]. Es ist bekannt, dass Tachykinin-positive Nervenfasern zusammen mit VIP und Acetylcholin die Schleimsekretion stimulieren, was bei chronischen Erkrankungen häufig gestört ist [76, 77]. Tachykinin mRNA oder die daraus resultierenden Peptide sind in zahlreichen Zellen des Immunsystems beschrieben worden [78]. Interessanterweise scheinen gerade die nicht-neuronalen Zellen ein den Tachykininen in Struktur und Funktion ähnliches Peptid zu exprimieren, dass von einem separaten Gen kodiert wird (TAC4) und das als Hämokinin



bezeichnet wird [79], so dass die in den Schleimdrüsen beschriebenen Zellen auch Hämokinin exprimieren könnten, da der benutzte Antikörper gegen das gemeinsamen carboxyterminalen Ende gerichtet ist. Eine Expression von Neurokinin B neben Hämokinin ist in humanen Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen beschrieben worden [80]. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigt, dass aus Geweben auch nach Stimulation mit Capsaicin, was zu einer Sekretion der gesamten Menge an Tachykininen aus sensiblen Nervenfasern führt, noch Substanz P aus verschiedenen Geweben und damit aus nicht-neuronalen Quellen extrahiert werden kann [81]. Sogar bei Invertebraten besteht die Möglichkeit einer Expression von Tachykinin-ähnlichen Peptiden in frei flotierenden Zellen der Hämolymphe, da bei dem lebenden Fossil *Nautilus pompilius* Zellen durch den pan-Tachykinin Antikörper markiert wurden [82].

CGRP wurde in Nervenfasern und epithelialen Neuroendocrine Bodies (NEB) in der humanen Lunge nachgewiesen [83]. Eine ähnliche Verteilung von CGRP ist auch für die Mauslunge beschrieben worden, wobei hier auch CGRP-haltige Nervenfasern in direktem Kontakt zu den NEBs stehen [84]. Der Rezeptor für CGRP fand sich sowohl im Endothel von pulmonalen und bronchialen Gefäßen, als auch in der glatten Muskulatur der Bronchien [85]. Die Anzahl der Zellen innerhalb der NEBs schwankt und ist bei Ratten unter anderem stammabhängig [86].

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tachykinine und CGRP in der humanen Lunge nicht nur in Nervenfasern lokalisiert sind, sondern, dass es auch nicht-neuronale Quellen gibt, Dies sind zum einen für die Tachykinine inflammatorische Zellen und zum anderen NEPs für CGRP.

### **3.2. Pharmakologische Effekte von CGRP und Tachykininen in der Lunge**

CGRP-Sekretion in den Atemwegen führt nur bei geschädigtem Bronchialepithel zu einer Kontraktion der Bronchien, wohingegen die Wirkung

auf den Bronchialtonus bei intaktem Epithel neutral ist [83]. Allerdings zeigte sich in pulmonalen Gefäßen eine starke Vasodilatation [83], die auch für die bronchialen Gefäße zu vermuten ist und die zusätzlich zu den kontraktiven Effekten von CGRP bei Asthma oder COPD die Atemwege weiter verengt, indem es durch die Dilatation der Gefäße zu einem Anschwellen der Bronchialwand kommt. Eine gesteigerte Vaskularisierung der Bronchien ist bei Patienten mit mildem Asthma beschrieben worden [87]. Darüber hinaus stellt CGRP einen wichtigen proliferativen Stimulus für verschiedene Zelltypen der Atemwege dar, unter anderem auch für die Epithelzellen [88], was im Zusammenhang mit chronischen Atemwegserkrankungen zu einer Hyperplasie des Epithels führen kann, wie dies für Asthma beschrieben ist [89]. Auch eine Hyperplasie der glatten Muskelzellen ist nachgewiesen worden [90]. Bei Asthma und COPD kommt es zu einer Hyperplasie der Schleimbecherzellen, was zu einer Obstruktion der Atemwege durch Hypersekretion führen kann [91].

Im Gegensatz zu den Effekten von CGRP kommt es durch die Sekretion von Tachykininen zu einer Kontraktion der Atemwege vieler Spezies, wobei dieses hauptsächlich durch den NKA präferierenden NK-2 Rezeptor vermittelt wird [92]. Allerdings kann es auch durch die Aktivierung des NK-1 Rezeptors zur Bronchokonstriktion kommen. Wir haben gezeigt, dass es in humanen Bronchien mittleren Durchmessers zu einer Prostanoid-unabhängigen Kontraktion kommt, die wahrscheinlich über direkte Effekte von Substanz P auf die glatte Muskulatur induziert wird. Dagegen ist die Substanz P-induzierte Kontraktion kleiner Bronchien abhängig von einer Aktivierung der Cyclooxygenase [93]. In einem Rauch-Modell konnte gezeigt werden, dass es bei der Ratte NK-1 abhängig zu einer Bronchokonstriktion kommt [94], wobei bekannt ist, dass Rauchexposition zu einer Sekretion von Tachykininen in der Lunge führt [95]. Bei Meerschweinchen wurde gezeigt, dass die Rauch-induzierte Bronchokonstriktion biphasisch verläuft und sich mit einem trippel NK1/NK2/NK3 Antagonisten inhibieren lässt [96]. Die Expression von Tachykinin-Rezeptoren ist bei Asthmatikern erhöht [97]. Zieht man in Betracht, dass es durch eine häufige Verwendung von Beta-2 Agonisten zu einer Hypersensibilisierung der Atemwege kommt, bei der auch die Expression von Tachykinin-Rezeptoren weiter erhöht wird [98], kann die NK-1 Rezeptor-vermittelte Bronchokonstriktion von großer Bedeutung sein.

### **3.3. Rolle von Tachykininen bei chronisch-inflammatorischen Erkrankungen der Lunge**

In der ausgeatmeten Luft von Asthmatikern sind erhöhte Spiegel von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gefunden worden [99], die wiederum zu einer Inaktivierung der neutralen Endopeptidase führen können, welches das wichtigste Enzym für den Abbau von Tachykininen darstellt [100]. Dies könnte zu den erhöhten Substanz P Werten in der broncho-alveolären Lavage von Asthmatikern beitragen, die nach Allergen-Challenge beschrieben wurden [101]. Auch bei Patienten mit Reflux sind im Sputum erhöhte Substanz P Spiegel nachgewiesen worden [102].

In peritonealen Mastzellen der Ratte ist eine Induktion von ROS durch Substanz P beschrieben worden [103]. In Schnittkulturen der Mauslunge wurde durch Inkubation mit [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP über 72 Stunden eine ähnliche Proliferationsinduktion in kleinen Arterien nachgewiesen, wie sie sonst unter hypoxischen Bedingungen zu finden ist. Dabei kommt es unter beiden Kulturbedingungen zur Bildung von ROS [104], die für diesen Vorgang des vaskulären Remodellings von großer Bedeutung sind [105]. Um den Effekt von Substanz P auf die Bildung von ROS und Remodelling in den Atemwegen abschätzen zu können, wurden wiederum Schnittkulturen von Lungen allergesierter Mäuse angefertigt und diese in-vitro mit dem Allergen gechallenged. Dabei zeigte sich eine starke Induktion von ROS in den Epithelzellen der Bronchien, welche durch einen Antagonisten (SR 140333) des NK-1 Rezeptors blockiert wurde [106]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei Rauchexposition gezeigt [94]. Capsaicin Exposition induzierte ebenfalls einen starken, NK-1 Rezeptor abhängigen Anstieg an ROS [106], so dass von einer neuronalen Quelle an Substanz P ausgegangen werden kann. Interessanterweise reagiert der TRPV1 Rezeptor, an den Capsaicin bindet und eine Sekretion von Substanz P aus den Nervenfasern bewirkt, auch auf ROS [107].

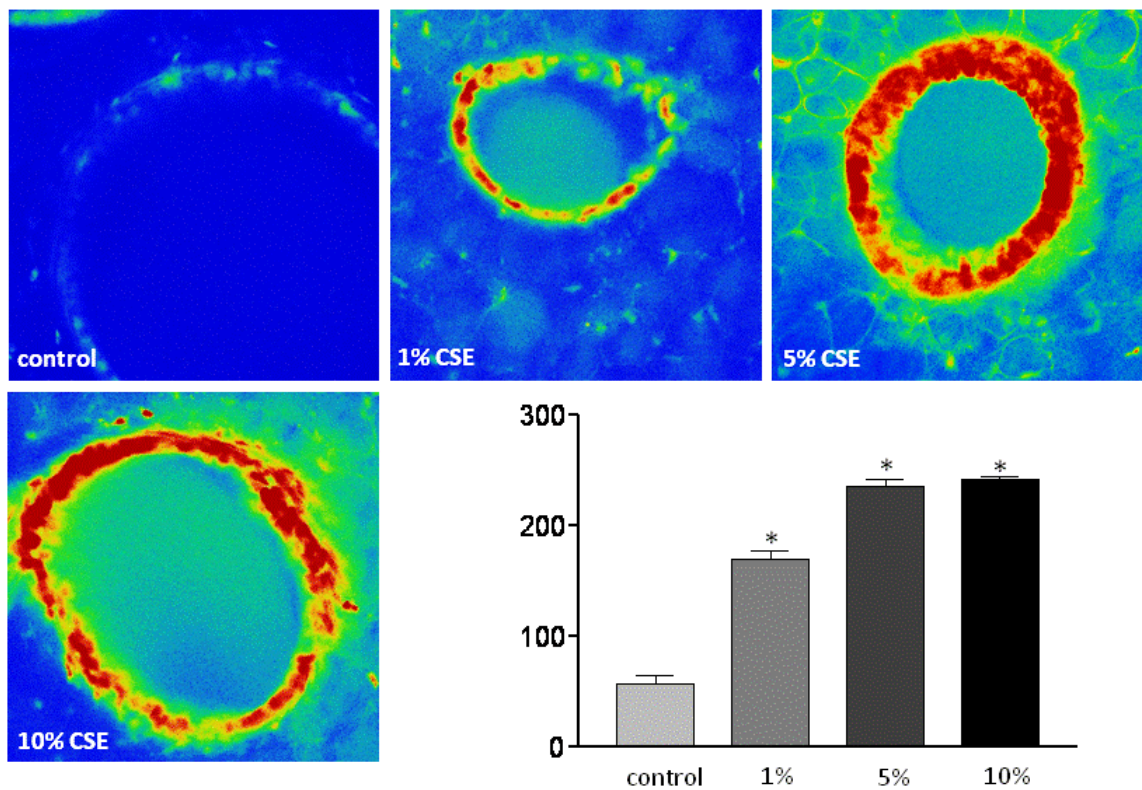
Um chronische Effekte zu simulieren, wurden die Schnitte mit [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP inkubiert. Dies führte kurzfristig ebenfalls zu einer starken ROS-Bildung und langfristig zu einer drastisch reduzierten Proliferation des Epithels und zu offensichtlichen Epithelschäden, was durch SR 140333 reduziert wurde. In Ratten, die Ozon ausgesetzt waren, kam es durch die Aktivierung des NK-1 Rezeptors zu Epithelschäden, die durch SR 140333 reduziert wurden, wobei SR 140333 selbst nicht als Radikalfänger agiert [108]. Darüber hinaus wurde eine Stabilisierung des Redox-sensitiven Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  durch Inkubation mit [Sar<sup>9</sup>, Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP in den Atemwegen vitaler Lungenschnitte gezeigt. HIF-1 $\alpha$  ist ein wichtiger Regulator der VEGF-Expression [109], die wiederum die Angiogenese stimuliert und so zu Hypervaskularisierung der Bronchien beiträgt [110]. ROS und Substanz P gelten unter anderem auch als mitogene Stimuli für die glatte Atemwegsmuskulatur [111]. In unseren Versuchen an Lungenschnitten wurde allerdings keine Proliferation der glatten Muskelzellen gefunden, was durch die Kulturbedingungen selbst oder durch die relativ kurze Versuchsdauer verursacht werden könnte.

In-vivo zeigte sich 48 Stunden nach Challenge bei allergesierten Mäusen, die vor der Allergenchallenge mit einem Radikalfänger (NAC) oder SR 140333 behandelt wurden, eine Reduktion der Epithelschäden und der Hyperplasie der Schleimbecherzellen. Ein ähnliches Remodelling tritt auch in der klinischen Situation auf [112]. Darüber hinaus tritt eine Verdickung der Basalmembran auf, was zu einer höheren Steifheit der Atemwege führt [113]. Transforming Growth Factor- $\beta$  1 ist durch die Stimulation der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen und die Inhibition von Matrix-abbauenden Enzymen ein wichtiger Mediator dieser fibrotischen Vorgänge [114]. In unserer Mausstudie kam es zusätzlich zu den Anti-Remodelling Effekten zu einer deutlichen Reduktion des inflammatorischen Infiltrats, was auch in einer weiteren Studie gezeigt werden konnte [115]. Weniger inflammatorische Zellen bedeuten letztlich eine geringere Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren und weniger Hypersensibilität.

In einer Zellkulturstudie wurde gezeigt, dass Substanz P auch bei der humanen bronchialen Epithelzelllinie A549 eine Dosis- und Zeit-abhängige Bildung von ROS auslöst. Es kommt dabei zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors

AP-1, was durch Reporterassays nachgewiesen wurde und abhängig von ROS und Kalzium ist [116]. Für Zigarettenrauch- und Asbest-Exposition ist ebenfalls eine AP-1 Transaktivierung beschrieben worden, die zu einer synergistischen Schädigung des Epithels mit daraus resultierender kompensatorischer Proliferation und Tumorbildung führen kann [117]. Weitere Versuche in A549 Zellen zeigen auch eine Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Substanz P, welche ebenfalls neben weiteren Faktoren, wie die MAP-Kinase Kaskade, Kalzium-abhängig war [118]. Eine elektrische Stimulation des efferenten Vagus führte in den Atemwegen der Ratte zu einer gesteigerten Sekretion von Substanz P, was neben einer Bronchokonstriktion eine Bildung von ROS und eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirkte [119]. Eine NK-1 Rezeptor-vermittelte Bildung von ROS wurde auch durch den Dunst bzw. Rauch von hochoverhitztem Öl beschrieben [94].

Bei COPD kommt es ebenfalls wie bei Asthma zu starken Veränderungen der extrazellulären Matrix, wobei auch hier TGF- $\beta$  eine herausragende Rolle spielt [120] [121]. Die intrazelluläre Signaltransduktion des TGF- $\beta$  Signals verläuft über die Gruppe der SMAD Transkriptionsfaktoren, wobei die inhibitorischen SMAD 6 und 7 als negativer Feedback Loop funktionieren, indem sie entweder kompetitiv an das Co-SMAD 4 binden oder direkt den TGF-Rezeptor inhibieren [122]. Inkubation von vitalen Lungenschnitten mit Zigarettenrauch-Extrakt führte zu einer starken Bildung von ROS im Bronchialepithel (Springer unveröffentlicht, siehe Abbildung 4). Dieser Extrakt stellt die nicht-flüchtigen Substanzen des Rauchs, das Kondensat, dar [123].



**Abbildung 4:** Zigarettenrauchextrakt (CSE) führt zu einem starken Anstieg der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in murinen Atemwegen, die in einer in-vitro Schnitkultur mit DCF-DA prä-inkubiert wurden (Springer unveröffentlicht).

A549 Zellen, die mit Zigarettenrauch-Extrakt inkubiert wurden, zeigten eine reduzierte mRNA Expression der inhibitorischen SMAD 6 und 7. Dagegen waren die Expression von den gemeinsamen Bindungspartner SMAD 4 und SMAD 3 nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Störung der Signalmodulation oder -terminierung hin, was die fibrotischen Vorgänge der Erkrankung verstärken könnte [124]. Die in Zellkultur beobachtete Verminderung der SMAD 6 und 7 Expression wurde auch in bronchialen Biopsien von COPD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen. In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass in Primärkultur von Fibroblasten, die von COPD-Patienten mit GOLD Status II und IV gewonnen wurden, Stimulation mit Zigarettenrauchextrakt zu einer verminderten SMAD 3 und 7 Expression führt [125], was unsere Daten bestätigt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Tachykinine und CGRP nicht nur Marker für eine gesteigerte Atemwegssensibilität sind, sondern in einem kausalen Zusammenhang mit der Pathophysiologie chronischer Atemwegserkrankungen stehen, da sie sowohl akute Effekte, wie das Anschwellen der Atemwegswände und zum Teil deren Kontraktion bewirken können, als auch für Schäden am Bronchialepithel verantwortlich sind und an den daraus resultierenden Remodelling-Prozessen beteiligt sind. Mechanistisch wird die schädigende Wirkung der Tachykinine durch eine NK-1 Rezeptor-vermittelte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht.

#### **3.4. Mögliche Bedeutung der Substanz P-induzierten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies**

Viele Zellen sind in der Lage ROS zu produzieren und auf zelluläre ROS bzw. Redox-Signale zu reagieren, wobei es zu einer veränderten Genexpression oder zu physiologischen und metabolischen Adjustierung an veränderte Sauerstofflevel kommt, was Proliferation, Seneszenz oder Apoptose zur Folge haben kann [126]. Dabei finden sich ROS-produzierende Enzymkomplexe aus der NADPHoxidase Familie in zahlreichen Geweben und Zellen, besonders in Epithelien, die in Kontakt mit der Außenwelt stehen, wie im Darm und der Lunge [127, 128]. Diese Enzymkomplexe liegen an der Oberfläche der Zellen, was vermuten lässt, dass sich die ROS-Produktion zur Abwehr gegen extrazelluläre Noxen und Pathogene richtet [129]. Es konnte nachgewiesen werden, dass mikrobielle Bestandteile als Agonisten agieren können und zur Bildung von ROS führen, was durch pro-inflammatorische Signale (z.B. Zytokine) via Induktion der Expression von ROS bildenden Enzymen weiter gesteigert werden kann [127, 130]. Interessanterweise ist diese Form der Immunabwehr auch bei Pflanzen beschrieben worden [131], so dass es sich um eine evolutionär alte Form der Abwehr handeln dürfte.

Zu dem Komplex der NADPHoxidase gehört als wichtiger regulatorischer Baustein p47phox, der in eigenen Versuchen mittels RT-PCR weder in A549 Zellen noch bronchialen Epithelzellen der Maus, die per Laser-Mikrodissektion gewonnen wurden, nachgewiesen werden konnte, so dass wir zu dem

Zeitpunkt der Untersuchungen davon ausgegangen sind, dass es nicht zur Ausbildung funktioneller NADPHoxidase Komplexen in diesen Zellen kommen kann. Die organisatorische Rolle von p47phox kann aber alternativ durch das Protein Noxo1 übernommen werden [132], welches in eigenen Studien nicht untersucht wurde. Dies eröffnet neben der mitochondrialen Bildung von ROS auch die Möglichkeit, dass ROS nach Allergen-Challenge über das NADPHoxidase System generiert werden können.

In eigenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Bildung von ROS im Bronchialepithel nach Allergen-Challenge sowohl in-vitro als auch in-vivo abhängig von der Aktivierung des NK-1 Rezeptors ist. Dabei wird die vorhandene Generierung von ROS durch NK-1 Rezeptor Aktivierung deutlich gesteigert, was zu Schäden im Epithel führen kann, die durch die Gabe von Radikalfängern reduziert werden können. Interessanterweise sind gewisse Level an ROS nötig für die Proliferation des Epithels [133], so dass eine vollständige Absorption von ROS nicht wünschenswert ist.

In einem Sepsismodell der Maus wurde gezeigt, dass die Depletion des PPT-A Gens nicht nur zu einer Reduktion der Mortalität führte, sondern auch zu einer Reduktion der Sepsis-assoziierten Lungenschädigung [134]. In diesem Modell wurde auch gezeigt, dass eine Inhibition des NK-1 Rezeptors zu einer verringerten Infiltration und zu weniger Epithelschäden in der Lunge führt [135]. Eine Induktion der NK-1, nicht aber der NK-2 Rezeptor Expression in Atemwegen durch RS-Viren ist beschrieben worden, wodurch die Atemwege für Substanz P sensibilisiert werden [136]. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurde eine Induktion einer nicht-neuronalen Expression von PPT-A in der Lunge nach Infektion mit einem Virus nachgewiesen [137]. Diese Induktion wurde 24 Stunden nach der Infektion gezeigt, noch bevor klinische Anzeichen einer Inflammation oder die Expression von pro-inflammatorischen Chemokinen nachgewiesen werden konnten. Eine Rauchexposition führt ebenfalls zur Sekretion von Substanz P und über die Aktivierung des NK-1 Rezeptors zur ROS-Generierung [94].

Zusammenfassend kann man sagen, dass es in den Atemwegen zu einer Sekretion von Tachykininen, besonders Substanz P, aus neuronalen und nicht-neuronalen Quellen kommt, was zur Induktion von ROS führt. Dieser NK-1



Rezeptor-abhängige Mechanismus wird bei vielen verschiedenen Noxen (Viren, Rauch, Bakterien und deren Bestandteile, sowie Allergenen) aktiviert. Er kann also als integraler Bestandteil der Immunantwort der Lunge angesehen werden. Dabei kann die Reaktion auf die gebildeten ROS von einer Stimulation von Neutrophilen [138], über eine Barrieren-Bildung durch oxidatives Cross-linking von Matrixproteinen [139] und einer Mukushypersekretion [140] bis zu Apoptose [141] variieren.

Da es sich bei der Bildung von ROS um ein evolutionär gesehen altes und primitives System der Immunabwehr handelt [142], unterscheidet das System nicht zwischen Pathogenen wie Viren und Bakterien oder an sich harmlosen Substanzen wie Allergenen, sofern das System über entsprechende Th-1 oder Th-2 Zytokine auf den jeweiligen Reiz sensibilisiert wurde.

Um nachzuweisen, dass es sich bei der Substanz P / NK-1 Rezeptor vermittelten Bildung von ROS um einen generellen Mechanismus der Immunabwehr auf unterschiedliche Noxen handelt, ist dies am Beispiel der Ethanol-induzierten Läsion des Magens untersucht worden [143]. Eine gesteigerte Generierung von ROS im Magen wird heute als signifikanter Faktor bei der Bildung von Ulcera angesehen [144]. In unserer Studie wurde nachgewiesen, dass hochprozentiges Ethanol im Magen zu einer Sekretion von Substanz P führt. Dies geschieht über den TRPV-1 Rezeptor, der von sensiblen, Tachykinin-positiven Neuronen exprimiert wird. Nach der Sekretion von Substanz P kommt es auch im Magen NK-1 Rezeptor-vermittelt zu einer Bildung von ROS und als Folge davon zur Schädigung der Mukosa. Auch Verabreichung von Capsaicin oder Substanz P führten zu einer Bildung von Läsionen in oberflächlichen Epithelzellen des Magens, wobei der TRPV-1 Rezeptor eine Schlüsselposition in dieser Kaskade besitzt. Der TRPV-1 Rezeptor reagiert neben Protonen und Vanilloiden wie Capsaicin, auch auf Bradykinin, Lipidmediatoren und erhöhte Temperatur [107].

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass es im Magen einen direkten Weg zur Sekretion von Substanz P aus sensiblen Neuronen gibt, nämlich über den TRPV-1 Rezeptor, wohingegen der genaue Weg wie Allergene in der Lunge zur Sekretion von Substanz P führen, noch unbekannt ist, aber eine Rolle des

TRPV-1 Rezeptor auch hier wahrscheinlich ist. Diese könnte über eine Protonen-Sekretion aus dem Atemwegsepithel vermittelt sein, die für human tracheale Epithelzellen beschrieben wurde [128]. Freigesetzte Protonen können den TRPV-1 Rezeptor aktivieren und so für eine Sekretion von Substanz P sorgen. Eine endogene, lokale Acidose ist bei chronischen Atemwegserkrankungen beschrieben worden [145, 146].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Tachykinin-vermittelte Aktivierung des NK-1 Rezeptors keinen speziellen Mechanismus der Atemwege darstellt, sondern es sich vermutlich um einen generellen Mechanismus handelt, da sie auch im Magen gezeigt werden konnte.

## **4. Zusammenfassung**

Die Expression von CGRP und Tachykininen konnte sowohl in Atemwegsprojizierenden Ganglien des sensiblen Nervensystems, als auch in inflammatorischen Zellen innerhalb der Lunge (Tachykinine) oder epithelialen Zellen (CGRP) gezeigt werden. Physiologisch bewirkt CGRP eine Vasodilatation der pulmonalen und bronchialen Gefäße, unter pathophysiologischen Bedingungen mit Epithelschäden kommt zu einer Konstriktion der Bronchien. Eine Aktivierung des Substanz P präferierenden NK-1 Rezeptors führt ebenfalls zu einer Vasodilatation, aber auch zur Bildung von großen Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese wiederum könnten den Transkriptionsfaktor AP-1 induzieren. Bei chronischer Exposition kann es zu Schädigungen des Bronchialepithels kommen. Interessanterweise reagieren die Zellen des Bronchialepithels sowohl auf allergene Stimuli als auch auf das Kondensat des Zigarettenrauchs mit der Bildung von ROS, so dass dieser Effekt unabhängig von einer TH<sub>1</sub> oder TH<sub>2</sub> Antwort des Immunsystems zu sein scheint. Darüber hinaus tritt die NK-1 Rezeptor-vermittelte Bildung von ROS auch im Magen auf, wenn hochdosiertes Ethanol oder niedrig dosiertes Ethanol in Kombination mit Substanz P in den Magen gelangt. Zusammenfassend kann man vermuten, dass Substanz P nicht nur einen modulierenden Effekt auf die Immunantwort hat, indem es für das Einwandern von inflammatorischen Zellen und die stärkere Aktivierung der Immunzellen sorgt, sondern auch selbst ein Teil einer Immunantwort ist, indem es Noxen direkt durch NK-1 Rezeptor-vermittelte Bildung von ROS neutralisiert. Der Verlust von Epithelzellen, wie in der Lunge beobachtet, wäre im Falle einer viralen Infektion sogar positiv, da infizierte Zellen absterben würden und dadurch die virale Replikation unterbrochen werden würde.

Eine chronische Aktivierung dieses Abwehrmechanismus führt dagegen zu den bei Asthma und COPD bekannten Remodelling-Prozessen, wie Hyperplasie des Bronchialepithels und dabei besonders der Schleimbecherzellen, zu starken Veränderungen der extrazellulären Matrix, sowie einer Hypersensibilität der Atemwege.

## **5. Literaturverzeichnis**

1. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother.* 1967; 31:138-51.
2. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest.* 2008; 118:3546-56.
3. Siddiqui S, Martin JG. Structural aspects of airway remodeling in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2008; 8:540-7.
4. Chung KF, Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999; 54:825-57.
5. Richardson JD, Vasko MR. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302:839-45.
6. Linden A. NANC neural control of airway smooth muscle tone. *Gen Pharmacol.* 1996; 27:1109-21.
7. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy.* 2004; 59:1139-52.
8. Groneberg DA, Springer J, Fischer A, Groneberg DA, Hartmann P, Dinh QT, Fischer A. Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(2) mRNA in human airways. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001; 14:391-401.
9. Bedoui S, Kawamura N, Straub RH, Pabst R, Yamamura T, von Horsten S. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J Neuroimmunol.* 2003; 134:1-11.
10. Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther.* 2002; 15:73-81.
11. Groneberg DA, Fischer A. Endogenous opioids as mediators of asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001; 14:383-9.
12. Richoux JP, Gelly JL, Bouhnik J, Baussant T, Alhenc-Gelas F, Grignon G, Corvol P. The kallikrein-kinin system in the rat hypothalamus. Immunohistochemical localization of high molecular weight kininogen and T kininogen in different neuronal systems. *Histochemistry.* 1991; 96:229-43.

13. Springer J, Geppetti P, Fischer A, Groneberg DA. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16:121-30.
14. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy.* 2000; 55:321-37.
15. Juaneda C, Dumont Y, Quirion R. The molecular pharmacology of CGRP and related peptide receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21:432-8.
16. Palmer JB, Barnes PJ. Neuropeptides and airway smooth muscle function. *Am Rev Respir Dis.* 1987; 136:S50-4.
17. Palmer JB, Cuss FM, Mulderry PK, Ghatei MA, Springall DR, Cadieux A, Bloom SR, Polak JM, Barnes PJ. Calcitonin gene-related peptide is localised to human airway nerves and potently constricts human airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1987; 91:95-101.
18. Keith IM, Pelto-Huikko M, Schalling M, Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide and its mRNA in pulmonary neuroendocrine cells and ganglia. *Histochemistry.* 1991; 96:311-5.
19. Buvry A, Yang YR, Tavakoli R, Frossard N. Calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves and neuroendocrine cells after lung transplantation in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20:1268-73.
20. Reynolds SD, Giangreco A, Power JH, Stripp BR. Neuroepithelial bodies of pulmonary airways serve as a reservoir of progenitor cells capable of epithelial regeneration. *Am J Pathol.* 2000; 156:269-78.
21. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature.* 1998; 393:333-9.
22. Mak JC, Barnes PJ. Autoradiographic localization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) binding sites in human and guinea pig lung. *Peptides.* 1988; 9:957-63.
23. Drissi H, Lasmoles F, Le Mellay V, Marie PJ, Lieberherr M. Activation of phospholipase C-beta1 via Galphaq/11 during calcium mobilization by calcitonin gene-related peptide. *J Biol Chem.* 1998; 273:20168-74.

24. Ninomiya H, Uchida Y, Endo T, Ohtsuka M, Nomura A, Saotome M, Hasegawa S. The effects of calcitonin gene-related peptide on tracheal smooth muscle of guinea-pigs in vitro. *Br J Pharmacol.* 1996; 119:1341-6.
25. Yule KA, White SR. Migration of 3T3 and lung fibroblasts in response to calcitonin gene-related peptide and bombesin. *Exp Lung Res.* 1999; 25:261-73.
26. Webber SE, Lim JC, Widdicombe JG. The effects of calcitonin gene-related peptide on submucosal gland secretion and epithelial albumin transport in the ferret trachea in vitro. *Br J Pharmacol.* 1991; 102:79-84.
27. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol.* 1997; 11:167-239.
28. McCormack DG, Mak JC, Coupe MO, Barnes PJ. Calcitonin gene-related peptide vasodilation of human pulmonary vessels. *J Appl Physiol.* 1989; 67:1265-70.
29. Martling CR. Sensory nerves containing tachykinins and CGRP in the lower airways. Functional implications for bronchoconstriction, vasodilatation and protein extravasation. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1987; 563:1-57.
30. Katayama M, Nadel JA, Bunnett NW, Di Maria GU, Haxhiu M, Borson DB. Catabolism of calcitonin gene-related peptide and substance P by neutral endopeptidase. *Peptides.* 1991; 12:563-7.
31. U.S. von Euler JHG. An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol. (London)* 1931; 72:74-87.
32. Tregear GW, Niall HD, Potts JT, Jr., Leeman SE, Chang MM. Synthesis of substance P. *Nat New Biol.* 1971; 232:87-9.
33. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol.* 1971; 232:86-7.
34. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 1995; 26:911-44.
35. Maggi CA. Tachykinins in the autonomic nervous system. *Pharmacol Res.* 1996; 33:161-70.

36. Page NM. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides*. 2005; 26:1356-68.
37. Helke CJ, Krause JE, Mantyh PW, Couture R, Bannon MJ. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *Faseb J*. 1990; 4:1606-15.
38. Tatemoto K, Lundberg JM, Jornvall H, Mutt V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 128:947-53.
39. Kage R, McGregor GP, Thim L, Conlon JM. Neuropeptide-gamma: a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from gamma-preprotachykinin. *J Neurochem*. 1988; 50:1412-7.
40. Carter MS, Krause JE. Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci*. 1990; 10:2203-14.
41. Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83:7074-8.
42. Lundberg JM, Hokfelt T, Martling CR, Saria A, Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res*. 1984; 235:251-61.
43. Hua XY, Theodorsson-Norheim E, Brodin E, Lundberg JM, Hokfelt T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept*. 1985; 13:1-19.
44. Kummer W, Fischer A, Kurkowski R, Heym C. The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience*. 1992; 49:715-37.
45. Shimosegawa T, Foda HD, Said SI. Immunohistochemical demonstration of enkephalin-containing nerve fibers in guinea pig and rat lungs. *Am Rev Respir Dis*. 1989; 140:441-8.
46. Canning BJ, Fischer A, Udem BJ. Pharmacological analysis of the tachykinin receptors that mediate activation of nonadrenergic,

- noncholinergic relaxant nerves that innervate guinea pig trachealis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284:370-7.
47. Takahashi K, Tanaka A, Hara M, Nakanishi S. The primary structure and gene organization of human substance P and neuromedin K receptors. *Eur J Biochem.* 1992; 204:1025-33.
  48. Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science.* 1987; 237:527-32.
  49. O'Dowd BF, Lefkowitz RJ, Caron MG. Structure of the adrenergic and related receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1989; 12:67-83.
  50. Bury RW, Mashford ML. Biological activity of C-terminal partial sequences of substance P. *J Med Chem.* 1976; 19:854-6.
  51. Hanley MR, Lee CM, Michell RH, Jones LM. Similar effects of substance P and related peptides on salivation and on phosphatidylinositol turnover in rat salivary glands. *Mol Pharmacol.* 1980; 18:78-83.
  52. Fischer A, Kummer W, Couraud JY, Adler D, Branscheid D, Heym C. Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab Invest.* 1992; 67:387-93.
  53. Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev.* 1995; 47:87-131.
  54. Buell G, Schulz MF, Arkininstall SJ, Maury K, Missotten M, Adami N, Talabot F, Kawashima E. Molecular characterisation, expression and localisation of human neurokinin-3 receptor. *FEBS Lett.* 1992; 299:90-5.
  55. Myers AC. Anatomical characteristics of tonic and phasic postganglionic neurons in guinea pig bronchial parasympathetic ganglia. *J Comp Neurol.* 2000; 419:439-50.
  56. Myers AC, Goldie RG, Hay DW. A novel role for tachykinin neurokinin-3 receptors in regulation of human bronchial Ganglia neurons. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171:212-6.
  57. Hsiue TR, Garland A, Ray DW, Hershenson MB, Leff AR, Solway J. Endogenous sensory neuropeptide release enhances nonspecific airway responsiveness in guinea pigs. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 146:148-53.
  58. Hall ME, Miley F, Stewart JM. The role of enzymatic processing in the biological actions of substance P. *Peptides.* 1989; 10:895-901.



59. Skidgel RA, Engelbrecht S, Johnson AR, Erdos EG. Hydrolysis of substance p and neurotensin by converting enzyme and neutral endopeptidase. *Peptides*. 1984; 5:769-76.
60. Cascieri MA, Bull HG, Mumford RA, Patchett AA, Thornberry NA, Liang T. Carboxyl-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity in vivo by captopril and MK-422. *Mol Pharmacol*. 1984; 25:287-93.
61. Kato T, Nakano T, Kojima K, Nagatsu T, Sakakibara S. Changes in prolyl endopeptidase during maturation of rat brain and hydrolysis of substance P by the purified enzyme. *J Neurochem*. 1980; 35:527-35.
62. Friedman WJ, Greene LA. Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res*. 1999; 253:131-42.
63. Lommatzsch M, Braun A, Renz H. Neurotrophins in allergic airway dysfunction: what the mouse model is teaching us. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 992:241-9.
64. Bonini S, Lambiase A, Bonini S, Angelucci F, Magrini L, Manni L, Aloe L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:10955-60.
65. Udem BJ, Hunter DD, Liu M, Haak-Frendscho M, Oakragly A, Fischer A. Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999; 118:150-3.
66. Fischer A, McGregor GP, Saria A, Philippin B, Kummer W. Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest*. 1996; 98:2284-91.
67. Hunter DD, Myers AC, Udem BJ. Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 161:1985-90.
68. Baraniuk JN. Mechanisms of allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2001; 1:207-17.
69. Kraneveld AD, Nijkamp FP. Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma. *Int Immunopharmacol*. 2001; 1:1629-50.

70. Frieri M. Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003; 90:34-40.
71. Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Springer J, Joachim RA, Arck PC, Klapp BF, Fischer A. Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34:1474-9.
72. Springer J, Wagner S, Subramamiam A, McGregor GP, Groneberg DA, Fischer A. BDNF-overexpression regulates the reactivity of small pulmonary arteries to neurokinin A. *Regul Pept.* 2004; 118:19-23.
73. Joachim RA, Cifuentes LB, Sagach V, Quarcoo D, Hagen E, Arck PC, Fischer A, Klapp BF, Dinh QT. Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36:1001-10.
74. Springer J, McGregor GP, Fink L, Fischer A. Alternative splicing in single cells dissected from complex tissues: separate expression of prepro-tachykinin A mRNA splice variants in sensory neurones. *J Neurochem.* 2003; 85:882-8.
75. Springer J, Groneberg DA, Pregla R, Fischer A. Inflammatory cells as source of tachykinin-induced mucus secretion in chronic bronchitis. *Regul Pept.* 2005; 124:195-201.
76. Rogers DF. The role of airway secretions in COPD: pathophysiology, epidemiology and pharmacotherapeutic options. *Copd.* 2005; 2:341-53.
77. Wine JJ. Parasympathetic control of airway submucosal glands: central reflexes and the airway intrinsic nervous system. *Auton Neurosci.* 2007; 133:35-54..
78. Groneberg DA, Harrison S, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A. Tachykinins in the respiratory tract. *Curr Drug Targets.* 2006; 7:1005-10.
79. Tran AH, Berger A, Wu GE, Paige CJ. Regulatory mechanisms in the differential expression of Hemokinin-1. *Neuropeptides.* 2009; 43:1-12.
80. Klassert TE, Pinto F, Hernandez M, Candenias ML, Hernandez MC, Abreu J, Almeida TA. Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells. *J Neuroimmunol.* 2008; 196:27-34.

81. Erin N, Ulusoy O. Differentiation of neuronal from non-neuronal Substance P. *Regul Pept.* 2009; 152:108-13. Epub 2008 Oct 25.
82. Springer J, Ruth P, Beuerlein K, Westermann B, Schipp R. Immunohistochemical localization of cardio-active neuropeptides in the heart of a living fossil, *Nautilus pompilius* L. (Cephalopoda, Tetrabranchiata). *J Mol Histol.* 2004; 35:21-8.
83. Springer J, Amadesi S, Trevisani M, Harrison S, Dinh QT, McGregor GP, Fischer A, Geppetti P, Groneberg DA. Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. *Regul Pept.* 2004; 118:127-34.
84. Brouns I, Oztay F, Pintelon I, De Proost I, Lembrechts R, Timmermans JP, Adriaensen D. Neurochemical pattern of the complex innervation of neuroepithelial bodies in mouse lungs. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131:55-74. Epub 2008 Sep 2.
85. Hagner S, Haberberger R, Kummer W, Springer J, Fischer A, Bohm S, Goke B, McGregor GP. Immunohistochemical detection of calcitonin gene-related peptide receptor (CGRPR)-1 in the endothelium of human coronary artery and bronchial blood vessels. *Neuropeptides.* 2001; 35:58-64.
86. Haworth R, Woodfine J, McCawley S, Pilling AM, Lewis DJ, Williams TC. Pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia: identification, diagnostic criteria and incidence in untreated ageing rats of different strains. *Toxicol Pathol.* 2007; 35:735-40.
87. Hoshino M, Takahashi M, Takai Y, Sim J, Aoike N. Inhaled corticosteroids decrease vascularity of the bronchial mucosa in patients with asthma. *Clin Exp Allergy.* 2001; 31:722-30.
88. Kawanami Y, Morimoto Y, Kim H, Nakamura T, Machida K, Kido T, Asonuma E, Yatera K, Yoshii C, Kido M. Calcitonin gene-related peptide stimulates proliferation of alveolar epithelial cells. *Respir Res.* 2009; 10:8.
89. Ishizaki M, Tanaka H, Kajiwara D, Toyohara T, Wakahara K, Inagaki N, Nagai H. Nafamostat mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108:355-63.

90. Carroll N, Elliot J, Morton A, James A. The structure of large and small airways in nonfatal and fatal asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147:405-10.
91. Sumi Y, Hamid Q. Airway remodeling in asthma. *Allergol Int.* 2007; 56:341-8.
92. Geppetti P, Tognetto M, Trevisani M, Amadesi S, Bertrand C. Tachykinins and kinins in airway allergy. *Expert Opin Investig Drugs.* 1999; 8:947-56.
93. Amadesi S, Moreau J, Tognetto M, Springer J, Trevisani M, Naline E, Advenier C, Fisher A, Vinci D, Mapp C, Miotto D, Cavallese G, Geppetti P. NK1 receptor stimulation causes contraction and inositol phosphate increase in medium-size human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163:1206-11.
94. Li PC, Chen WC, Chang LC, Lin SC. Substance P acts via the neurokinin receptor 1 to elicit bronchoconstriction, oxidative stress, and upregulated ICAM-1 expression after oil smoke exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 294:L912-20..
95. Lee LY, Lou YP, Hong JL, Lundberg JM. Cigarette smoke-induced bronchoconstriction and release of tachykinins in guinea pig lungs. *Respir Physiol.* 1995; 99:173-81.
96. Tsuchida H, Takahashi S, Nosaka E, Kuraya T, Yamashita M, Morimoto K. Novel triple neurokinin receptor antagonist CS-003 inhibits respiratory disease models in guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2008; 596:153-9. Epub 2008 Jul 31.
97. Adcock IM, Peters M, Gelder C, Shirasaki H, Brown CR, Barnes PJ. Increased tachykinin receptor gene expression in asthmatic lung and its modulation by steroids. *J Mol Endocrinol.* 1993; 11:1-7.
98. Faisy C, Naline E, Diehl JL, Emonds-Alt X, Chinet T, Advenier C. In vitro sensitization of human bronchus by beta2-adrenergic agonists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:L1033-42.
99. Jobsis Q, Raatgeep HC, Hermans PW, de Jongste JC. Hydrogen peroxide in exhaled air is increased in stable asthmatic children. *Eur Respir J.* 1997; 10:519-21.

100. Dusser DJ, Djokic TD, Borson DB, Nadel JA. Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pig. Possible role of free radicals. *J Clin Invest.* 1989; 84:900-6.
101. Nieber K, Baumgarten C, Rathsack R, Furkert J, Laake E, Muller S, Kunkel G. Effect of azelastine on substance P content in bronchoalveolar and nasal lavage fluids of patients with allergic asthma. *Clin Exp Allergy.* 1993; 23:69-71.
102. Patterson RN, Johnston BT, Ardill JE, Heaney LG, McGarvey LP. Increased tachykinin levels in induced sputum from asthmatic and cough patients with acid reflux. *Thorax.* 2007; 62:491-5. Epub 2007 Jan 24.
103. Brooks AC, Whelan CJ. Reactive oxygen species generation by mast cells in response to substance P: a NK1-receptor-mediated event. *Inflamm Res.* 1999; 48:S121.
104. Springer J, Fischer A. Substance P-induced pulmonary vascular remodelling in precision cut lung slices. *Eur Respir J.* 2003; 22:596-601.
105. Nisbet RE, Graves AS, Kleinhenz DJ, Rupnow HL, Reed AL, Fan TH, Mitchell PO, Sutliff RL, Hart CM. The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009; 40:601-9.
106. Springer J, Groneberg DA, Dinh QT, Quarcoo D, Hamelmann E, Braun-Dullaeus RC, Geppetti P, Anker SD, Fischer A. Neurokinin-1 receptor activation induces reactive oxygen species and epithelial damage in allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37:1788-97.
107. Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533:207-14.
108. Oslund KL, Hyde DM, Putney LF, Alfaro MF, Walby WF, Tyler NK, Schelegle ES. Activation of neurokinin-1 receptors during ozone inhalation contributes to epithelial injury and repair. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008; 39:279-88.
109. Semenza GL. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in pulmonary pathophysiology. *Chest.* 2005; 128:592S-4S.

110. Yanai M, Sekizawa K, Ohrui T, Sasaki H, Takishima T. Site of airway obstruction in pulmonary disease: direct measurement of intrabronchial pressure. *J Appl Physiol.* 1992; 72:1016-23.
111. Roth M, Johnson PR, Borger P, Bihl MP, Rudiger JJ, King GG, Ge Q, Hostettler K, Burgess JK, Black JL, Tamm M. Dysfunctional interaction of C/EBPalpha and the glucocorticoid receptor in asthmatic bronchial smooth-muscle cells. *N Engl J Med.* 2004; 351:560-74.
112. Warner SM, Knight DA. Airway modeling and remodeling in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008; 8:44-8.
113. Saglani S, Molyneux C, Gong H, Rogers A, Malmstrom K, Pelkonen A, Makela M, Adelroth E, Bush A, Payne DN, Jeffery PK. Ultrastructure of the reticular basement membrane in asthmatic adults, children and infants. *Eur Respir J.* 2006; 28:505-12.
114. Duvernelle C, Freund V, Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16:181-96.
115. Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh QT, Arck PC, Klapp BF. Neurokinin-1 receptor mediates stress-exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Psychosom Med.* 2004; 66:564-71.
116. Springer J, Pleimes D, Scholz FR, Fischer A. Substance P mediates AP-1 induction in A549 cells via reactive oxygen species. *Regul Pept.* 2005; 124:99-103.
117. Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogen-activated protein kinases in lung epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; 34:666-9.
118. Williams R, Zou X, Hoyle GW. Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292:L430-7.
119. Li PC, Li SC, Lin YJ, Liang JT, Chien CT, Shaw CF. Thoracic vagal efferent nerve stimulation evokes substance P-induced early airway bronchoconstriction and late proinflammatory and oxidative injury in the rat respiratory tract. *J Biomed Sci.* 2005; 12:671-81.

120. Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Tura M, Zuin R, Beghe B, Maestrelli P, Fabbri LM, Saetta M. Airway inflammation in childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:798-803.
121. Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, Finkbeiner W, Jones K, Broaddus VC, Sheppard D, Barzcak A, Xiao Y, Erle DJ, Nishimura SL. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J Clin Invest.* 2007; 117:3551-62.
122. Groneberg DA, Witt H, Adcock IM, Hansen G, Springer J. Smads as intracellular mediators of airway inflammation. *Exp Lung Res.* 2004; 30:223-50.
123. van der Toorn M, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJ, Gans RO, Koeter GH, Choi AM, van Oosterhout AJ, Slebos DJ. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 1:1.
124. Postma DS, Timens W. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:434-9.
125. Zandvoort A, Postma DS, Jonker MR, Noordhoek JA, Vos JT, Timens W. Smad gene expression in pulmonary fibroblasts: indications for defective ECM repair in COPD. *Respir Res.* 2008; 9:83.
126. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol.* 1999; 65:337-40.
127. Geiszt M, Lekstrom K, Brenner S, Hewitt SM, Dana R, Malech HL, Leto TL. NAD(P)H oxidase 1, a product of differentiated colon epithelial cells, can partially replace glycoprotein 91phox in the regulated production of superoxide by phagocytes. *J Immunol.* 2003; 171:299-306.
128. Schwarzer C, Machen TE, Illek B, Fischer H. NADPH oxidase-dependent acid production in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:36454-61.
129. El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin JC, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon R, Kaniewski J, Noel-Hudson MS, Bidart JM, Schlumberger M, Virion A, Dupuy C. Dual

- oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005; 288:G933-42.
130. Kuwano Y, Kawahara T, Yamamoto H, Teshima-Kondo S, Tominaga K, Masuda K, Kishi K, Morita K, Rokutan K. Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006; 290:C433-43.
  131. Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, Katou S, Kawakita K, Rowland O, Jones JD, Doke N. *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell.* 2003; 15:706-18.
  132. Miyano K, Sumimoto H. Role of the small GTPase Rac in p22phox-dependent NADPH oxidases. *Biochimie.* 2007; 89:1133-44.
  133. Ranjan P, Anathy V, Burch PM, Weirather K, Lambeth JD, Heintz NH. Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:1447-59.
  134. Puneet P, Hegde A, Ng SW, Lau HY, Lu J, Moochhala SM, Bhatia M. Preprotachykinin-A gene products are key mediators of lung injury in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2006; 176:3813-20.
  135. Hegde A, Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M. Neurokinin-1 receptor antagonist treatment protects mice against lung injury in polymicrobial sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 82:678-85.
  136. King KA, Hu C, Rodriguez MM, Romaguera R, Jiang X, Piedimonte G. Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24:101-7.
  137. Stewart JP, Kipar A, Cox H, Payne C, Vasiliou S, Quinn JP. Induction of tachykinin production in airway epithelia in response to viral infection. *PLoS ONE.* 2008; 3:e1673.
  138. Swain SD, Rohn TT, Quinn MT. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4:69-83.
  139. Edens WA, Sharling L, Cheng G, Shapira R, Kinkade JM, Lee T, Edens HA, Tang X, Sullards C, Flaherty DB, Benian GM, Lambeth JD. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain



- oxidase/oxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox. *J Cell Biol.* 2001; 154:879-91.
140. Shao MX, Nadel JA. Neutrophil elastase induces MUC5AC mucin production in human airway epithelial cells via a cascade involving protein kinase C, reactive oxygen species, and TNF-alpha-converting enzyme. *J Immunol.* 2005; 175:4009-16.
141. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1703-15.
142. Leto TL, Geiszt M. Role of Nox family NADPH oxidases in host defense. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:1549-61.
143. Gazzieri D, Trevisani M, Springer J, Harrison S, Cottrell GS, Andre E, Nicoletti P, Massi D, Zecchi S, Nosi D, Santucci M, Gerard NP, Lucattelli M, Lungarella G, Fischer A, Grady EF, Bunnett NW, Geppetti P. Substance P released by TRPV1-expressing neurons produces reactive oxygen species that mediate ethanol-induced gastric injury. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:581-9.
144. Peng YC, Hsu CL, Tung CF, Chou WK, Huang LR, Hung DZ, Hu WH, Yang DY. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen species in gastric cancer, ulcer and antral mucosa. *Hepatogastroenterology.* 2008; 55:770-3.
145. Hunt JF, Fang K, Malik R, Snyder A, Malhotra N, Platts-Mills TA, Gaston B. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:694-9.
146. Ricciardolo FL, Gaston B, Hunt J. Acid stress in the pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113:610-9.

## **6. Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Anker danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit in der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe und die vielen intensiven Diskussionen und freundschaftlichen Gespräche, die mir bei der Verwirklichung eigener Ideen und Konzepte halfen und auch weiterhin helfen werden.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank auch meinen anderen akademischen Lehrern und Kollegen, die mich in den letzten Jahren gefördert haben. Besonders hervorzuheben sind dabei:

Herr Prof. Dr. Axel Fischer, in dessen Arbeitsgruppe ich die Daten für die meisten Arbeiten der Habilitationsschrift sammeln konnte. Herr Prof. Dr. Dr. David Groneberg, der mir immer mit Rat und Tat hilfreich zur Seite stand und mir bei der Konzeption der vorliegenden Schrift sehr geholfen hat.

Für die geduldige und freundliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeiten und die vielen netten Stunden möchte ich mich darüber hinaus sehr herzlich bei meinen Kollegen und Freunden, Herrn PD Dr. Q. Thai Dinh, Herrn Dr. Dr. Wolfram Döhner, Frau Anika Hartmann, Herrn Arne Hillmann, Herrn Prof. Dr. Gerald McGregor, Frau Sandra Palus, Herrn Dr. Dr. Christian Peiser, Herrn Dr. David Quarcoo, Herrn Dr. Frank Scholz, Frau Rita Strozynski, Herrn Dr. Dr. Stephan von Haehling und Frau Silke Wiegand bedanken.

Weiterhin möchte ich mich ebenfalls bei meinen weiteren Koautoren bedanken, die mir im Rahmen von Kooperationen halfen, die in dieser kumulativen Arbeit beschriebenen Daten zu erheben und publizieren.

Der letzte und auch größte Dank gebührt meiner Familie. Ich möchte mich für die immerwährende liebevolle Hilfe, Unterstützung und Verständnis bei meiner Frau Rebecca, meinen Kindern Joshua, Jonas, Hannah, Johannes und Marie, sowie dem Rest meiner Familie ganz besonders bedanken.

## **7. Erklärung**

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- Weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern / Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind.
- dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist;

Falkensee, den