

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Psychosomatik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Tachykininerge Nerven der Maus bei chronisch-  
entzündlichen Atemwegserkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ervin Mingomataj

aus Tirana/Albanien

Gutachter: 1. Priv. -Doz. Dr. med. Q. T. Dinh  
2. Prof. Dr. med. J. Virchow  
3. Prof. Dr. em. med. G. Schultze-Werninghaus

Datum der Promotion: 9 September 2011

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Titel, Autoren und Abstrakt</b>	5
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	6
1.1	Anatomischer Hintergrund	6
1.2	Die sensible Atemwegsinnervation	6
1.3	Zielstellung der kumulativen Doktorarbeit	6
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	7
2.1	Versuchstiere	7
2.2	Retrograde neuronale Markierung	7
2.2.1	Retrograde neuronale Markierung zur Identifizierung von Neuronen mit Projektion zur Nase	7
2.2.2	Retrograde neuronale Markierung zur Identifizierung von Neuronen mit Projektion zur Lunge	7
2.3	NGF Instillation in die Nase	8
2.4	Allergisierung mit Ovalbumin (OVA)	8
2.5	Gewebe	8
2.6	Doppelimmunfluoreszenz	9
<b>3.</b>	<b>Veränderungen der sensiblen Atemwegsinnervation unter patho-physiologischen Bedingungen</b>	9
3.1	Trigeminal sensible Innervation	9
3.2	Vagal sensible Atemwegsinnervation unter normalen und pathologischen Bedingungen	10
3.3	Spinale Atemwegsinnervation	11
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	11
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	13
<b>6.</b>	<b>Promotionsrelevante Publikationen</b>	15

<b>7.</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>16</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung zur Publikationsliste Ervin Mingomataj</b>	<b>17</b>
<b>9.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>18</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>19</b>

**Titel:** Die sensible Atemwegsinnervation der Maus unter der physiologischen Bedingungen und bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen

**Autoren:** E. Mingomataj, Q.T. Dinh, D. Groneberg, W. Feleszko, B. Schmeck, R. Joachim, O. Noga, S. Nagel, B.F. Klapp, A. Fischer.

**Abstrakt:**

Es ist bekannt, dass eine Reihe von Stimuli wie Capsaicin, Bradykinin, hyperosmotische Salzlösung und Zigarettenrauch in der Lage sind, sensible Atemwegsneurone zu aktivieren und zu einer Freisetzung von einer Vielzahl von Mediatoren wie Tachykinine Substanz P (SP) und Neurokinin A (NKA) zu führen. Tachykinine sind mitverantwortlich für die nasale Hyperreaktivität, die bronchiale Obstruktion und die chronischen Entzündungen in den Atemwegen.

Im Gegensatz zu zahlreichen Informationen über deren pharmakologischen Effekten ist der Mechanismus der Biosynthese und die Freisetzung von Tachykininen wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Tachykinin-Induktion in trigeminalen nasalen Neuronen unter Exposition von NGF und in atemwegspezifischen vagal-sensiblen Neuronen bei der allergischen Atemwegsentzündung untersucht.

Mit Hilfe von neuronal Tracing-Technik im Mausmodell für die allergische Atemwegsentzündung konnte die Effekte von NGF und OVA an der Induktion von Tachykininen in sensiblen Neuronen nachgewiesen werden. Nach NGF-Applikation wurden Tachykinine in glutamin-negativen, neurofilament-positiven und neurofilament-negativen Neuronen nachgewiesen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass nasal-spezifische trigeminale Neurone aus einer heterogenen Subpopulationen von Neuronen bestehen. In weiteren Experimenten konnte nach der Sensibilisierung mit OVA eine Tachykinin-Induktion in sensiblen atemwegsspezifischen Neuronen mit myelinisierten Axonen nachgewiesen werden. Sehr wahrscheinlich handelt sich hier um eine ganz neue neuronale Subpopulation, die durch einen Stimulus wie ein Allergen mit der Synthese und Freisetzung von pro-inflammatorischen Neuropeptiden reagieren.

Allergisierung führt zu einer Erhöhung von NGF, dieses verstärkt die Freisetzung und Induktion von Tachykininen aus sensiblen Neuronen mit einer Verstärkung der neurogenen Atemwegsentzündung.

## **1. Einleitung**

### **1.1 Anatomischer Hintergrund**

Die Atemwege werden anatomisch in einem oberen (Nasen-Rachen-Raum bis zu der Trachea) und unteren Atemtrakt unterteilt. Die unteren Atemwege setzen sich aus den beiden Hauptbronchien, Bronchien, Bronchioli und Ductuli alveolares und Aveolen der Lunge zusammen. Die Atemwege werden von sympathischen, parasympathischen und sensiblen Nervenfasern innerviert (Barnes, P. J., 1986, Dinh et al. 2006b).

### **1.2 Die sensible Atemwegsinnervation**

Sensible Versorgung der oberen Atemwegen stammen aus dem Ganglion trigeminale, wobei die vorderen Anteile der Nase vom N. ophthalmicus und sowie dem Septum und die hinteren Anteile aus dem N. maxillaris versorgt werden (Hunter and Dey, 1998, Dinh et al., 2003). Die sensible Innervation der unteren Atemwege kommt aus den vagalen sensiblen Ganglien jugulare und nodosum. Es handelt sich hier um pseudounipolare Neurone, deren Axone mit dem N. vagus (N. laryngeus recurrens, Rr. bronchiales) verlaufen und die Lunge innervieren. Eine zusätzliche sensible Versorgung der unteren Atemwege stammt aus den thorakalen Spinalganglien (Kummer et al., 1992).

Sensible Nervenfasern erhalten nicht nur Informationen aus Erregungen von Berührungs- und Dehnungsrezeptoren an der Trachea, den Bronchen, oder den Bronchioli, sondern auch Erregungsinformationen unter der Pleura. Aktivierung dieser Neurone kann zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Neuropeptiden wie Tachykininen und dem mit den Tachykininen nicht verwandten Neuropeptid Calcitonin gene related Peptid (CGRP) führen, die zu einer Entzündung in den Atemwegen führen können (Barnes, P. J et al., 1998).

### **1.3 Zielstellung der kumulativen Arbeit:**

Folgende Fragen sollen beantwortet werden: - wie verändert sich die sensible Atemwegsinnervation bezüglich der Neuropeptid-Expression insbesondere der Tachykinine bei allergischer Atemwegsentzündung und unter Behandlung mit NGF? - In welchen neuronalen Subpopulationen werden Tachykinine induziert? - die Auswirkungen der Expression von Tachykininen auf die Atemwegsentzündung und insbesondere auf Zellen des Immunsystems sollen hier auch untersucht werden.

## **2. Methodik**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die verschiedenen Experimente wurden ausgewachsene Mäuse (BALB/c) beiderlei Geschlechts (Charles River Laboratories und Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 15-20 g verwendet. Nur Tiere ohne klinische Anzeichen von Erkrankungen wurden für die Untersuchungen ausgewählt.

### **2.2 Retrograde neuronale Markierung**

#### **2.2.1 Retrograde neuronale Markierung zur Identifizierung von Neuronen mit Projektion zur Nase**

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Freiburg, Deutschland; 50mg/kg Körpergewicht) und Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland; 50mg/kg Körpergewicht) betäubt, analgetisiert und relaxiert. Mit Hilfe einer Plastikkanüle, die als Verlängerung der Spritze der 10- $\mu$ l Mikropipette Syringe (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) dient, wurde 2,5  $\mu$ l Fast Blue (2% wässrige Lösung enthält 1% DMSO, Dr. K Illing, Groß Umstadt, Deutschland) in den vorderen und hinteren Nasenraum injiziert. Die Tiere wurden bis zu fünf Mal um die eigene Achse gedreht, damit sich der Farbstoff auf die Nasenschleimhaut gleichmäßig verteilte. Die operierten Tiere wurden unter einer UV-Lampe bis zum Aufwachen vor Unterkühlung geschützt. Die Tiere erholten sich schnell nach der Operation und begannen sofort zu fressen. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen bis sie zur Auswertung getötet wurden.

#### **2.2.2 Retrograde neuronale Markierung zur Identifizierung von Neuronen mit Projektion zur Lunge**

Nach der Betäubung wie oben beschrieben, wurde die Trachea mit einem medianen, zervikalen Längsschnitt ventral freigelegt und durch einen kleinen Schnitt zwischen zwei benachbarten Knorpelspannen eröffnet. Die Kanüle der 10- $\mu$ l Mikropipette Syringe (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde durch den ventralen Schlitz bis in den rechten Hauptbronchus eingeführt und 5  $\mu$ l Fast Blue (2% wässrige Lösung enthält 1% DMSO, Dr. K Illing, Groß Umstadt, BRD) injiziert. Die Trachealinzision wurde mit einer 7-0 Vicryl Naht (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und der Hautschnitt mit einer 4-0 Vicryl-Naht (Ethicon) zugenäht. Die operierten Tiere wurden unter einer UV-Lampe bis zum Aufwachen vor

Unterkühlung geschützt. Die Tiere erholten sich schnell nach der Operation und begannen sofort zu fressen. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen bis sie nach 7 Tagen ausgewertet wurden (Fischer et al., 1993).

### **2.3 NGF Instillation in die Nase**

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis, Freiburg, Deutschland; 50mg/kg Körpergewicht) und Dihydro-Thiazin-Hydrochlorid (Rompun, Bayer, Leverkusen, Deutschland; 50mg/kg Körpergewicht) betäubt, analgetisiert und relaxiert. Mit Hilfe einer Plastikkanüle, die als Verlängerung der Spritze der 10- $\mu$ l Mikropipette Syringe (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) dient, wurde 5  $\mu$ l NGF (0.1 mg/ml Genentech Inc., Kalifornien, USA) oder 5  $\mu$ l NaCl 0,9% in den vorderen und hinteren Nasenraum injiziert. Alle Tiere konnten sich ungestört erholen bis sie ausgewertet wurden.

### **2.4 Allergisierung mit Ovalbumin (OVA)**

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 10  $\mu$ l Ovalbumin (OVA, Grad VI, Sigma, Deisenhofen, Germany) und 1,5 mg Aluminium Hydroxide Al(OH)<sub>3</sub> (AlumImjekt, Pierce, Rockford, IL, USA) als Adjuvanz am 1., 14. und 21. Tag behandelt und am 26. bis 27. Tag 24 Stunden vor der Analyse mit inhalativer 1% OVA Lösung provoziert. Die inhalative Provozierung mit in Phosphatpuffer (PBS) verdünnter OVA Lösung dauerte 20 Minuten.

### **2.5 Gewebe**

Den operierten Tieren wurden nach Tötung durch CO<sub>2</sub>-Intoxikation die Lungen mit der Trachea (als Thoraxpaket), die Spinalganglien und die Ganglien jugulare/nodosum (als Komplex, beidseits) entnommen. Die durch die Eröffnung des Thorax kollabierten Lungen wurden zur Optimierung der Fixierung und Erleichterung der späteren Bearbeitung intraluminal mit Zamboni-Lösung (2% Paraformaldehyd, 15% gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4) durch die Trachea perfundiert. Alle Gewebeproben wurden in Zamboni-Lösung für ca. 24 Stunden, abhängig von der Gewebeprobengröße, immersionsfixiert. Nach mehrmaligem Spülen mit 0,1 M PP, pH 7,4, wurde das Gewebe in einem 18% saccharosehaltigen 0,1 M PP für ca. 24 Stunden zur Kryoprotektion überführt. Für die weitere Bearbeitung wurde das Gewebe mit OTC (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) auf



Filterpapier aufgebracht, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und dann bei  $-80\text{ C}$  aufbewahrt. Von den gefrorenen Ganglien wurden bei  $-25\text{C}$  in einem Kryostaten (Frigocut E, Fa. Reichert, Nussloch, Deutschland)  $8\ \mu\text{m}$  dicke Serienschritte (Lungengewebe,  $12\ \mu\text{m}$  dick) angefertigt und auf Chromalaun/Gelatine beschichtete Objekt-träger aufgenommen. Die Schnitte wurden danach bei Dunkelheit für 30 Minuten luftgetrocknet und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt (Fischer et al., 1992).

## **2.6 Doppelimmunfluoreszenz**

Das mit Tracer markierte Gewebe muss bei der Bearbeitung vor Lichteinfall geschützt werden. Alle Schnitte wurden vor der Weiterverarbeitung mit immun-histochemischen Methoden eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer Blocklösung aus 10% normalem Schweineserum, 0,5% Tween, 0,1% Rinderserumalbumin in Phosphatpuffer (PBS) mit 1,8%igem Salzgehalt für eine Stunde vorinkubiert. Nach zweimaligem Spülen in PBS wurden die Primärantikörper gegen Substanz P (SP) oder andere Antigene in ihren entsprechenden Verdünnungen aufgetragen. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion des Primärantikörpers wurden nach zweimaligem Spülen (2x 10 Minuten) in PBS die entsprechenden Sekundärantikörper für eine Stunde aufgetragen. Dabei wurden ein Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) Anti-Kaninchen-IgG-Antiserum von der Ziege, für SP-Antiserum ein biotinyliertes Anti-Ratten-IgG vom Schaf oder ein Cy-TM-3-konjugiertes Anti-Ratten-IgG vom Esel aufgetragen. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Schnitte mit Streptavidin Texas Rot zur Markierung des biotinylierten Antikörpers für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurden die Schnitte noch einmal gewaschen und in gepuffertem Glycerol (pH 8,6) eingedeckt (Fischer et al., 1996).

## **3. Ergebnisse - Veränderungen der sensiblen Atemwegsinnervation unter patho-physiologischen Bedingungen**

### **3.1 Trigeminale sensible Innervation**

Den Ursprung der sensiblen Innervation der oberen Atemwege wurde mittels neuronalen Tracings im Ganglion trigeminale gefunden. Neurone, die zur Nase projizieren wurden im Bereich der Aufteilung der Nervi ophthalmicus und maxillaris gefunden, so dass die Ergebnisse der Untersuchung auf eine somatotopische

Organisation dieser Neurone innerhalb des Ganglions schließen lassen. In Kombination von neuronalen Tracing Techniken mit der Immunhistochemie konnten etwa 5 - 6 % der nasal-spezifischen Neurone mit Expression von Tachykininen wie SP/NKA bei der Maus unter normalen Bedingungen nachgewiesen werden. Weitere durchgeführten Untersuchungen zu der Verteilung und Ko-Lokalisation der Capsaicin-Rezeptoren (TRPV1, früher VR1) mit SP in nasal-spezifischen Neuronen konnten eine fast komplette Ko-Lokalisation von SP und TRPV1 in Neuronen mit Projektion zur Nasenschleimhaut zeigen.

Unter normalen Bedingungen wurde SP in nasal-spezifischen neurofilament-negativen, glutaminergen und C-Fasern Neurone synthetisiert. Injektion von NGF in die Nase führte zu einer Induktion von SP in trigeminalen Neuronen. Die Induktion von SP erreichte den höchsten Punkt 24 Stunden nach NGF Applikation. Substanz P wurde in glutamin-negativen, neurofilament-positiven wie auch in neurofilament-negativen Neuronen nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nasal-spezifische trigeminale Neurone aus einer heterogenen Subpopulationen von Neuronen bestehen, die aufgrund ihrer Neuropeptidprofile im Hinblick auf die neurogene Entzündung verschiedene Effekte auf die Nasenschleimhaut vermitteln können.

### **3.2 Vagal sensible Atemwegsinnervation unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen**

Sensible Nervenfasern, die die unteren Atemwege und die Lunge der Maus innervieren, stammen bei der Maus ähnlich wie bei den anderen Spezies aus dem Ganglion jugulare und dem Ganglion nodosum. Unter normalen Bedingungen werden Tachykinine ausschließlich in sensiblen Neuronen mit einem kleinen Durchmesser gefunden. Im Vergleich zu den Meerschweinchen wurden bei den Mäusen sehr viel weniger Neurone mit Tachykinin Expression gefunden, welches auf einen spezies-spezifischen Unterschied in der Neuropeptid Expression hinweisen kann.

Nach der Sensibilisierung der Mäuse mit OVA wurden Tachykinine in atemspezifischen Neuronen mit größerem Durchmesser gefunden. Die Induktion von Tachykininen in sensiblen Neuronen wurde ähnlich wie bereits beim Meerschweinchen nach Allergensensibilisierung und Provokation mit OVA beobachtet. Bei der Maus fand die Induktion von Tachykininen meistens in sensiblen

atemwegsspezifischen Neuronen mit myelinisierten Axonen (A $\delta$ -Fasern) statt. Sehr wahrscheinlich handelt sich hier um eine ganz neue neuronale Subpopulation, die durch einen Stimulus wie Allergen mit der Synthese und Freisetzung von pro-inflammatorischen Neuropeptiden reagiert.

### **3.3 Spinale Atemwegsinnervation**

Ein weiteres wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Neuropeptidexpression in den atemwegsspezifischen Spinalganglienneuronen zu untersuchen. Bisher war bekannt, dass die Lunge von Spinalganglien innerviert wird. Aber über die Rezeptor- und Neuropeptidexpression der Spinalganglien wurde kaum berichtet. Im Hinblick auf neuronale Plastizität sensibler Neuronen unter verschiedenen patho-physiologischen Bedingungen wurde zuerst die Expression für trkA, TRPV1 und SP in Spinalganglienneuronen von unbehandelten, gesunden, erwachsenen BALB/-c Mäusen untersucht. In Ko-Lokalisationsuntersuchungen mit Doppel-Immunhistochemie und neuronalem Tracing wurden Fast blue-markierte Neurone auf die Expression und Ko-Lokalisation von SP und TRPV1 oder SP und trkA untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass atemspezifische Neurone mit SP Expression fast immer den Rezeptor TRPV1 exprimieren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass atemspezifische Spinalganglien-Neurone auch an der neurogenen Entzündung in den Atemwegen beteiligt sind. Spinalganglienneurone mit Projektion zur Lunge zeigten außer SP-Expression auch den Rezeptor für Neurotrophine wie NGF. Sie exprimierten den trkA Rezeptor an ihren Nervenfasern und Zellkörpern, so dass NGF als Ligand an den trkA-Rezeptor binden und diesen aktivieren kann. Daher haben Neurotrophine vermutlich eine wichtige Funktion bei der Aktivierung dieser Neurone im Hinblick auf die Neuropeptid Expression und Freisetzung von pro-inflammatorischen Neuropeptiden. SP, welches aus spinalen sensiblen Nervenfasern freigesetzt wird, kann über Aktivierung des NK-1 Rezeptors neurogene Entzündung induzieren.

## **4. Diskussion**

Das Interesse an der Maus als Allergie-Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der Atemwegserkrankung wie Asthma ist in den letzten Jahren, insbesondere durch die Möglichkeit der Verwendung von genetisch veränderten Mäusen, stetig gestiegen. In der vorliegenden kumulativen Arbeit soll die Rolle der

sensiblen Atemwegsinnervation im Hinblick auf die Neuropeptid- und Rezeptorexpression bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie Allergischer Rhinitis und Asthma bronchiale untersucht werden. Allergene und andere Reize können Entzündungsreaktionen in der Schleimhaut der Atemwege auslösen. In den oberen Atemwegen kann es zu einer nasalen, und in den unteren Atemwegen zu einer bronchialen Hyperreaktivität kommen. Die Nasenschleimhaut reagiert auf verschiedene Reize mit den klinischen Symptomen Obstruktion, Sekretion und Niesreiz. In den unteren Atemwegen kann es zu einer Obstruktion mit einer Verlegung des Lumens der Atemwege infolge von Schleimhautödemen, gestörter Schleimsekretion und Bronchospasmen kommen.

Zuerst wurde die Expression und Verteilung von SP in trigeminalen und vagal-sensiblen Ganglien der Maus unter normalen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit konnten zeigen, dass sensible Neurone, die die oberen und unteren Atemwege der Maus innervieren, in der Lage sind, Neuropeptide wie SP in ihren Zellkörpern zu synthetisieren. Die Expression von SP und neuronalen Rezeptoren in atemwegsspezifischen Neuronen des Ganglion trigeminale und des Spinalganglion bei der Maus wurden untersucht und mit den Vordaten von anderem Spezies wie bei der Ratte verglichen. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigten, dass die Anzahl der trigeminalen Neuronen, die in die Nase ziehen und SP exprimieren bei der Maus (4,9% der retrograd-markierten Neuronen) geringer ist im Vergleich zu Ratten (81,6%) und Meerschweinchen (Dinh et al. 2003, Lazarov, N. E., 2002). Die geringere Expression von SP bei der Maus im Vergleich zu der Ratte liegen wahrscheinlich in den Spezies-spezifischen Unterschieden. Eine komplette Ko-Lokalisation der Capsaicin-Rezeptoren (TRPV1, früher VR1) mit SP in nasal-spezifischen Neuronen lässt vermuten, dass TRPV1 an der Biosynthese und Freisetzung von SP aus den trigeminalen sensiblen Neuronen beteiligt sein könnte (Dinh et al., 2005, Hunter et al., 2000b).

Eine Reihe von Stimuli wie thermischer, mechanischer oder chemischer Reiz wie Toluoldiisocyanat (TDI), ein Gemisch aus 2,4- und 2,6-Isomeren, sind in der Lage die SP Biosynthese in den nasal-spezifischen Neuronen zu induzieren. Die Freisetzung von SP verstärkt die Entzündung in der Nasenschleimhaut (Hunter et al., 2000a). TDI kann durch Inhalation aufgenommen werden und reizt die Augen, die Haut und die Atemwege.

In weiteren Studien wurde die Induktion von SP in sensiblen Neuronen, die zur Nase (trigeminale Neurone) oder Lunge (Neurone aus Jugulare/Nodosum) ziehen, bei der Maus, der Ratte und dem Meerschweinchen nachgewiesen. Die Induktion der SP Expression führt in allen Tiermodellen zu einer Verstärkung der allergischen Entzündung in den Atemwegen. Es wurde gezeigt, dass eine Freisetzung von SP zur örtlichen Vasodilatation, Hypersekretion und Mastzelldegranulation in den Atemwegen führt. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass gleichzeitig mit der Induktion von SP in vagal-sensiblen Neuronen die Anzahl der Eosinophilen in der bronchoalveolären Lavage der Atemwege zunahm (Dinh et al., 2003, 2004a, Fischer et al., 1996, Hunter et al., 2000a, Kollarik et al., 2003, Meyers et al., 2002, Udem et al. 1999).

Mit *in vivo* Studien konnte die Biosynthese von SP in nasal-spezifischen trigeminalen Neuronen durch die Injektion vom Nervenwachstumsfaktor (NGF) in die Nase, induziert werden. Unsere und vorherige Ergebnisse lassen vermuten, dass NGF über eine Aktivierung der Neurotrophin Rezeptoren wie des trkA Rezeptors die Induktion von SP in sensiblen Atemwegsneuronen vermittelt (De Vries et al., 1999, Dinh et al., 2004b, De Vries et al., 2006).

Bei der Aktivierung der sensiblen Neuronen durch einen Reiz wie bei der Sensibilisierung/Provokation mit Ovalbumin oder TDI, kommt es zu einer Erhöhung von NGF, das zu einer Freisetzung und Induktion von Tachykininen aus sensiblen Neuronen führt, und die neurogene Atemwegsentzündung verstärkt.

## 5. Literaturverzeichnis

- Barnes, P. J., (1986). Asthma as an axon reflex. *Lancet*. 1, 242-245.
- Barnes, P. J., Chung, K. F. und Page, C. P., (1998). Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev.* 50, 515-596.
- de Vries, A., Dessing, M. C., Engels, F., Henricks, P. A. und Nijkamp, F. P., (1999). Nerve growth factor induces a neurokinin-1 receptor-mediated airway hyperresponsiveness in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 159, 1541-1544.
- de Vries, A., Engels, F., Henricks, P. A., Leusink-Muis, T., McGregor, G. P., Braun, A., Groneberg, D. A., Dessing, M. C., Nijkamp, F. P. und Fischer, A., (2006). Airway hyper-responsiveness in allergic asthma in guinea-pigs is mediated by nerve growth factor via the induction of substance P: a potential role for trkA. *Clin Exp Allergy.* 36, 1192-1200.
- Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Mingomataj, E., Peiser, C., Heppt, W., Dinh, S., Arck, P. C., Klapp, B. F. und Fischer, A., (2003). Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa. *Neuropeptides.* 37, 245-250.
- Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Peiser, C., Mingomataj, E., Joachim, R. A., Witt, C., Arck, P. C., Klapp, B. F. und Fischer, A., (2004a). Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 144, 15-24.
- Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Peiser, C., Springer, J., Joachim, R. A., Arck, P. C., Klapp, B. F. und Fischer, A., (2004b). Nerve growth factor-induced substance P in capsaicin-insensitive vagal neurons innervating the lower mouse airway. *Clin Exp Allergy.* 34, 1474-1479.
- Dinh, Q. T., Klapp, B. F. und Fischer, A., (2006). [Airway sensory nerve and tachykinins in asthma and COPD]. *Pneumologie.* 60, 80-85.
- Dinh, Q. T., Mingomataj, E., Quarcoo, D., Groneberg, D. A., Witt, C., Klapp, B. F., Braun, A. und Fischer, A., (2005). Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways. *Clin Exp Allergy.* 35, 820-825.
- Fischer, A., Canning, B. J. und Kummer, W., (1996). Correlation of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase with choline acetyltransferase in the airway innervation. *Ann N Y Acad Sci.* 805, 717-722.

- Fischer, A., Kummer, W., Couraud, J. Y., Adler, D., Branscheid, D. und Heym, C., (1992). Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea. *Lab Invest.* 67, 387-393.
- Fischer, A., McGregor, G. P., Saria, A., Philippin, B. und Kummer, W., (1996). Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest.* 98, 2284-2291.
- Fischer, A., Mundel, P., Mayer, B., Preissler, U., Philippin, B. und Kummer, W., (1993). Nitric oxide synthase in guinea pig lower airway innervation. *Neurosci Lett.* 149, 157-160.
- Hunter, D. D. und Dey, R. D., (1998). Identification and neuropeptide content of trigeminal neurons innervating the rat nasal epithelium. *Neuroscience.* 83, 591-599.
- Hunter, D. D., Myers, A. C. und Udem, B. J., (2000a). Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 1985-1990.
- Hunter, D. D., Satterfield, B. E., Huang, J., Fedan, J. S. und Dey, R. D., (2000b). Toluene diisocyanate enhances substance P in sensory neurons innervating the nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 543-549.
- Kollarik, M., Dinh, Q. T., Fischer, A. und Udem, B. J., (2003). Capsaicin-sensitive and -insensitive vagal bronchopulmonary C-fibres in the mouse. *J Physiol.* 15;551(Pt 3):869-79.
- Kummer, W., Fischer, A., Kurkowski, R. und Heym, C., (1992). The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry. *Neuroscience.* 49, 715-737.
- Lazarov, N. E., (2002). Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus. *Prog Neurobiol.* 66, 19-59.
- Myers, A. C., Kajekar, R. und Udem, B. J., (2002). Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282, L775-781.
- Udem, B. J., Hunter, D. D., Liu, M., Haak-Frendscho, M., Oakragly, A. und Fischer, A., (1999). Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. *Int Arch Allergy Immunol.* 118, 150-153.

## 6. Promotionsrelevante Publikationen

1. Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., **Mingomataj, E.**, Peiser, C., Heppt, W., Dinh, S., Arck, P. C., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2003) Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa.  
Neuropeptides. **37**, 245-250 IF (2007): 2.492

\_15\_ Prozent

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Experimente,  
Abfassung dieser Anteile am Manuskript

2. Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Peiser, C., **Mingomataj, E.**, Joachim, R. A., Witt, C., Arck, P. C., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2004) Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung.  
Respir Physiol Neurobiol. **144**, 15-24 IF (2007): 2.202

\_10\_ Prozent

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Experimente,  
Abfassung dieser Anteile am Manuskript

3. Dinh, Q. T., **Mingomataj, E.**, Quarcoo, D., Groneberg, D. A., Witt, C., Klapp, B. F., Braun, A. and Fischer, A. (2005) Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways.  
Clin Exp Allergy. **35**, 820-825 IF (2007): 3.729

\_25\_ Prozent

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Durchführung der Experimente und Auswertung, wesentliche Beteiligung bei  
Erstellung des Manuskripts

4. **Mingomataj, E.**, Dinh, Q. T., Groneberg, D., Feleszko, W., Schmeck, B., Joachim, R., Noga, O., Nagel, S., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2008) Trigeminal nasal-specific neurons respond to nerve growth factor with substance-P biosynthesis.  
Clin Exp Allergy. **38**, 1203-1211 IF (2007): 3.729

\_35\_ Prozent

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Studienplanung, Durchführung der Experimente und Auswertung, wesentliche  
Abfassen des Manuskripts

Antragsteller

Betreuer

Ervin Mingomataj

Quoc Thai Dinh

## **7. Curriculum vitae**

„Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.“

Ervin Mingomataj



## 8. Erklärung zur Publikationsliste Ervin Mingomataj

1. Mingomataj, E., Priftanji, A., Qirko, E., Dinh, Q. T., Fischer, A., Peiser, C. and Groneberg, D. A. (2002) Specific immunotherapy in Albanian patients with anaphylaxis to hymenoptera venoms.  
BMC Dermatol. **2**, 11 IF (2007): n.a.
2. Mingomataj, E., Ohri, D., Dhimitri, V., Priftanji, A., Qirko, E., Pani, L., Fischer, T. C., Dinh, Q. T., Peiser, C., Fischer, A. and Groneberg, D. A. (2003) Hymenoptera sting anaphylactic reactions in the Mediterranean population of Albania.  
J Investig Allergol Clin Immunol. **13**, 272-277 IF (2007): 1.254
3. Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Mingomataj, E., Peiser, C., Heppt, W., Dinh, S., Arck, P. C., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2003) Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa.  
Neuropeptides. **37**, 245-250 IF (2007): 2.492
4. Dinh, Q. T., Groneberg, D. A., Peiser, C., Mingomataj, E., Joachim, R. A., Witt, C., Arck, P. C., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2004) Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung.  
Respir Physiol Neurobiol. **144**, 15-24 IF (2007): 2.202
5. Dinh, Q. T., Mingomataj, E., Quarcoo, D., Groneberg, D. A., Witt, C., Klapp, B. F., Braun, A. and Fischer, A. (2005) Allergic airway inflammation induces tachykinin peptides expression in vagal sensory neurons innervating mouse airways.  
Clin Exp Allergy. **35**, 820-825 IF (2007): 3.729
6. Mingomataj, E. C. (2006) Favorable hymenoptera sting reactions during childhood may have enabled transmission of responsible allergic genotype into generations.  
Med Hypotheses. **67**, 327-332 IF (2007): 1.276
7. Mingomataj, E. C., Xhixha, F. and Gjata, E. (2006) Helminths can protect themselves against rejection inhibiting hostile respiratory allergy symptoms.  
Allergy. **61**, 400-406 IF (2007): 5.014
8. Mingomataj, E. C. and Rudzeviciene, O. (2007) From latent incubation launched into hostile symptomatic pathology: A probable survival strategy for common respiratory infectious agents.  
Med Hypotheses. **68**, 397-400 IF (2007): 1.276
9. Mingomataj, E. C., Xhixha, F., Gjata, E., Hyso, E. and Qirko, E. (2008) Prevalence of a family history of atopic disease among 3 generations of atopic respiratory patients in Tirana, Albania.  
J Investig Allergol Clin Immunol. **18**, 190-193 IF (2007): 1.254
10. Mingomataj, E. C. (2008) Eosinophil-induced prognosis improvement of solid tumors could be enabled by their vesicle-mediated barrier permeability induction.  
Med Hypotheses. **70**, 582-584 IF (2007): 1.276
11. Mingomataj, E. C., Gjata, E., Xhixha, F. and Hyso, E. (2008) A case of isocyanate-induced asthma possibly complicated by food allergy after peanut consumption: a case report.  
J Occup Med Toxicol. **3**, 29 IF (2007): n.a.
12. Mingomataj, E., Dinh, Q. T., Groneberg, D., Feleszko, W., Schmeck, B., Joachim, R., Noga, O., Nagel, S., Klapp, B. F. and Fischer, A. (2008) Trigeminal nasal-specific neurons respond to nerve growth factor with substance-P biosynthesis.  
Clin Exp Allergy. **38**, 1203-1211 IF (2007): 3.729

Ervin Mingomataj  
- Antragsteller -

PD Dr. Q. Thai Dinh  
- Betreuer -

## 9. Erklärung

„Ich, Ervin Mingomataj, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die sensible Atemwegsinnervation der Maus unter normalen Situation und bei chronisch-entzündlichen Atemwegserkrankungen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

20. 11. 2009

Ervin Mingomataj

## 10. Danksagung

Ich möchte ganz herzlich einen besonderen Dank an meinen Betreuer PD Dr. med. Quoc Thai Dinh aussprechen, der sowohl in allen Bereichen und Schritte meiner experimentellen Forschungstätigkeit, als auch während der Doktorarbeitsverfassung mir entscheidend geholfen hat. Ohne seinen Unterstützung wäre fast unmöglich die Vorbereitung der Doktorarbeit.

Ein aufrichtigen Dank möchte ich an Herrn Prof. Dr. Ulrich Wahn aussprechen. Er ermöglichte mir sowohl im klinischen als auch in Forschungs-Bereichen von Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie die Weiterbildung. Seine Unterstützung war entscheidend für meine Weiterbildung in der Allergologie in Berlin.

Ich fühle mich an Herrn Prof. Dr. Axel Fischer sehr verpflichtet und bedanke mich herzlich an Ihm, denn Er gab mir die Möglichkeit in der allergologische Forschergruppe unter den optimalen Bedingungen zu arbeiten. Gleichzeitig, Prof. Dr. Axel Fischer war für mich während der gesamten Forschungsarbeit ein geduldiger Berater und Unterstützer.

Für die geduldige und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeiten möchte ich mich von ganzen Herzen bei meinen Kollegen und Freunden Herr Prof. Dr. David A. Groneberg, Herr Dr. Dr. med. Christian Peiser, Herr Dr. rer. nat. Jochen Springer, Frau Rita Strozynski, Frau und Herr Marc Scheibner bedanken.

Nicht zuletzt spreche ich ein besonderer Dank bei meinen weiteren Koautoren: An Herr Dr. med. Wojchiech Feleszko, Herr Dr. med. Bernd Schmeck, Herr Dr. med. David Quarcoo, Frau Dr. med. Richarda A. Joachim, Herr Dr. med. Oliver Noga, Dr. med. Stefan Nagel, Herr Prof. Dr. Burkhard F. Klapp, Herr Prof. Dr. Christian Witt, Herr Dr. rer. nat. Armin Braun, Herr Prof. Dr. Werner Heppt, Herr Dr. med. Stephen Dinh, and Frau Prof. Dr. Petra C. Arck. Ohne Ihre Zusammenarbeit wäre diese kumulative Arbeit nicht möglich gewesen.

Die Europäische Akademische Gesellschaft für Allergie und Immunologie „The European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)“ und Asthma European Network (GA<sup>2</sup>LEN), sowie die Europäische Respiratorische Gesellschaft „The European Respiratory Society (ERS)“, die mir ermöglichten National und auch International Forschungsprojekte durchzuführen, danke ich recht, recht herzlich für die Unterstützung meiner Forschung.

An dieser Stelle möchte ich mich für die liebevolle Hilfe und Unterstützung bei meiner Frau Alketa, meinen Eltern und bei meiner Schwester Doris bedanken.

Der Autor