Aus dem CharitéCentrum 12 Innere Medizin und Dermatologie,
Medizinische Klinik m. S. Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantitative Veränderung der Substanz P-Expression dermaler Neurone nach Allergen-Sensibilisierung von $TRPV_1$-knockout Mäusen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sabine Sander
aus Dresden

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Q.T. Dinh

2. Prof. Dr. Dr. M. Steinhoff

3. Prof. Dr. med. T. Zuberbier

Datum der Promotion: 18.09.2009

Für meine Mutter.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **6**

1 EINLEITUNG **8**

1.1 DIE HAUT **8**
1.1.1 ATOPISCHE DERMATITIS 11
1.2 SUBSTANZ P **12**
1.2.1 NEUROPEPTIDE – VERBINDUNG ZWISCHEN IMMUN- UND NERVENSYSTEM 12
1.2.2 DIE FAMILIE DER TACHYKININE 13
1.2.3 SUBSTANZ P - VORKOMMEN, WIRKUNG UND BEDEUTUNG 16
1.3 DIE NEUROGENE ENTZÜNDUNG **17**
1.4 CAPSAICIN – EIN AUSLÖSER DER NEUROGENEN ENTZÜNDUNG **21**
1.5 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1 ($TRPV_1$) **23**
1.6 FRAGESTELLUNG **25**

2 MATERIAL UND METHODEN **26**

2.1 VERSUCHSTIERE **26**
2.2 SENSIBILISIERUNG **27**
2.3 GEWEBEENTNAHME UND –BEARBEITUNG **28**
2.4 IMMUNHISTOCHEMIE - DOPPELIMMUNFLUORESZENZ **28**
2.5 HE-FÄRBUNG **30**
2.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG **31**

3 ERGEBNISSE **32**

3.1 AUSWERTUNG **32**
3.2 SUBSTANZ P **34**
3.2.1 INJEKTIONSSTELLE HAUT 34
3.2.2 GANGLIEN TH1-5 LINKS 35
3.3 RETROGRADE NEURONALE MARKIERUNG **37**
3.4 CO-LOKALISATION VON SUBSTANZ P UND FLUOROGOLD **39**

3.5 GRUPPE 3 **41**

3.6 ENTZÜNDUNGSPROZESS DER HAUT **42**

4 DISKUSSION **44**

4.1 ERGEBNISSE **44**

4.2 METHODENKRITIK **44**

4.2.1 TIERMODELL 44

4.2.2 KNOCKOUT MAUSMODELL 45

4.2.3 RETROGRADE NEURONALE MARKIERUNG - TRACING 46

4.3 SUBSTANZ P-REGULIERUNG **47**

4.3.1 NERVE GROWTH FACTOR (NGF) 47

4.3.2 PROTEINASE-ACTIVATED REZEPTOR 2 (PAR2) 48

4.3.3 GLUKOKORTIKOIDE 48

4.3.4 NEUTRALE ENDOPEPTIDASE UND ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYM 49

4.3.5 TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1 ($TRPV_1$) 49

ZUSAMMENFASSUNG **54**

LITERATURVERZEICHNIS **56**

LEBENSLAUF **71**

DANKSAGUNG **72**

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **73**

Abkürzungsverzeichnis

ACE	angiotensin converting enzym
AlOH	Aluminium-Hydroxid
ANP	atriales natriuretisches Peptid
CCK	Cholecystokinin
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CRH	Corticotrophin-releasing Hormon
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNANC	exitatorisches nicht-adrenerges nicht-cholinerges System
FG	Fluorogold
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül
iNANC	inhibitorisches nicht-adrenerges nicht-cholinerges System
mRNA	messanger ribonucleinacid
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon
NaCl	Natriumchlorid
NANC	nicht-adrenerges nicht-cholinerges System
NEP	neutrale Endopeptidase
NGF	nerve growth factor
NK_1	Neurokinin 1
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NOS	nitric oxide synthase
NPY	Neuropeptid Y
OVA	Ovalbumin
PACAP	pituitary adenylatecyclase activating peptide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzsäure
PGP	protein gene product
PHI	peptide histidin-isoleucin
PHM	peptide histidin-methionin
PP	Phosphatpuffer
PPT-A-Gen	Präprotachykinin A-Gen
PPT-B-Gen	Präprotachykinin B-Gen

SP	Substanz P
Th1-5	thorakale Spinalganglien 1-5
trkA-Rezeptor	tropomyosin-related kinase A-Rezeptor
TRP	transient receptor potential
$TRPV_1$	transient receptor potential vanilloid 1
VCAM-1	vaskuläres zelluläres Adhäsionsmolekül
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VR_1	Vanilloidrezeptor Typ1
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Substanz P (SP), ein Neuropeptid aus der Familie der Tachykinine, ist an der Ausprägung allergischer Erkrankungen durch Auslösung einer neurogenen Entzündung maßgeblich beteiligt. Die Prävalenz dieser atopischen Erkrankungen nimmt in unserer Gesellschaft immer weiter zu, so dass auch das Interesse an einer genaueren Erforschung der Ursachen und damit verbunden möglicher Therapieansätze steigt. In neueren Studien konnte der Rezeptor $TRPV_1$ (transient receptor potential vanilloid) als ein Aktivator der neurogenen Entzündung durch Freisetzung von Substanz P bestätigt werden. Vermutlich ist er aber nicht nur für die Freisetzung, sondern auch für die Expression von Substanz P verantwortlich. Da für $TRPV_1$ bereits gut wirksame Antagonisten existieren, würde der Rezeptor einen erfolgsversprechenden Ansatzpunkt für die Behandlung allergischer und inflammatorischer Erkrankungen liefern [1]. Die Hauptaufgabe dieser Arbeit besteht daher darin gezielt die Beteiligung von $TRPV_1$ an der Substanz-P-Expression, speziell am Modell der atopischen Dermatitis, zu untersuchen.

1.1 Die Haut

Die Haut ist flächenmäßig das größte (1,5 - 2 m^2), das schwerste (bis zu 10 kg) und funktionell das vielseitigste Organ des menschlichen Körpers. Sie dient als metabolisch aktive biologische Barriere der Abgrenzung von Innen und Außen (Hüllorgan), dem Schutz vor Umwelteinflüssen, der Repräsentation, Kommunikation und Wahrung der Homöostase. Weiterhin übernimmt die Haut wichtige Funktionen im Bereich des Stoffwechsels und der Immunologie und verfügt über vielfältige Anpassungsmechanismen. Aufgrund der engen Beziehung zur Psyche wird sie auch als "Spiegel der Seele" bezeichnet.

Die äußere Haut (Cutis) gliedert sich prinzipiell in zwei Hauptschichten (siehe Abbildung 1): Die Epidermis (Oberhaut), bestehend aus einem mehrschichtigen verhornenden Plattenepithel mit den epithelialen Hautanhangsgebilden und die Dermis (Lederhaut oder Corium), bestehend vorwiegend aus Bindegewebsfasern mit den nicht-epithelialen Hautanhangsgebilden. Die Dermis dient der Ernährung und Verankerung der Epidermis und enthält die für die Temperaturregelung wichtige glatte Muskulatur und die Blutgefäße. Struktur und Dicke der beiden Komponenten variieren je nach anatomischer Lokalisation: Im Durchschnitt ist die Epidermis 0,1 mm stark, an den Akren jedoch bis zu 1,6 mm.

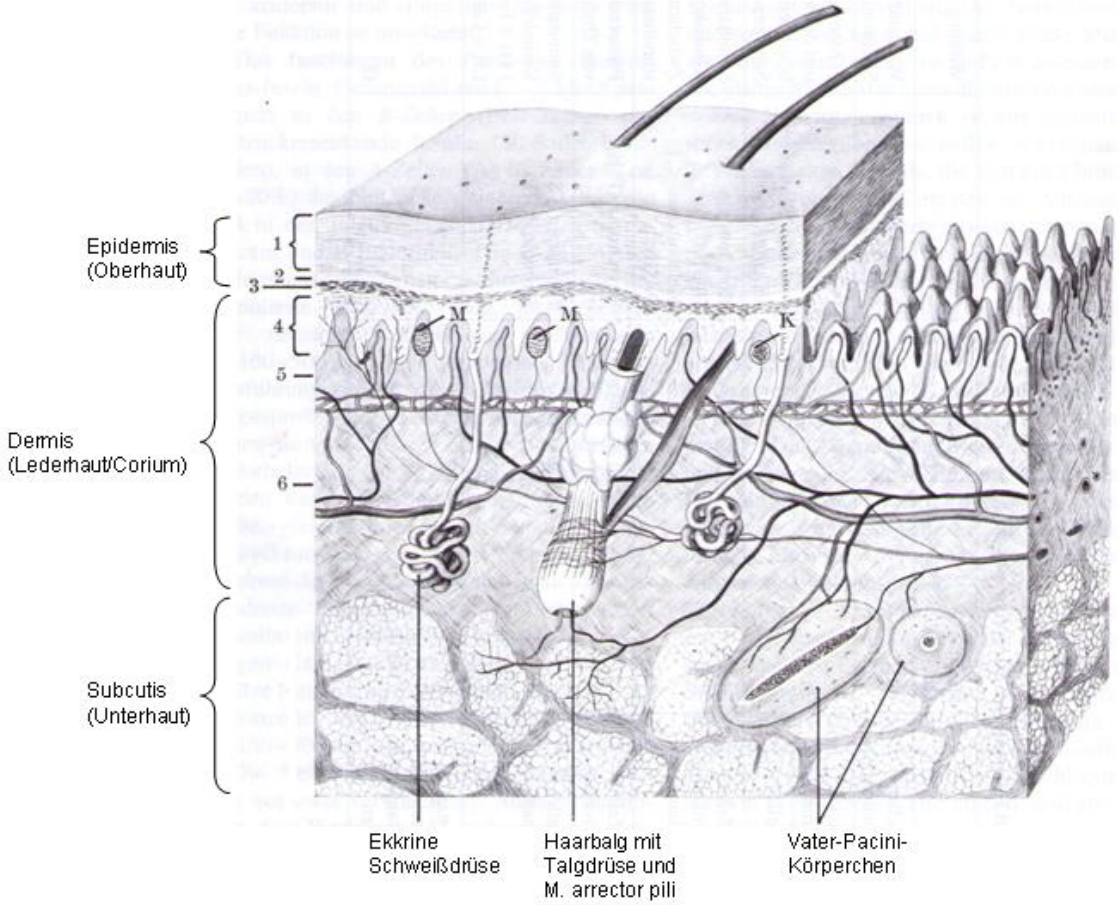

Abbildung 1: Aufbau der menschlichen Haut (Querschnitt) [2]
M = Meißner-Tastkörperchen; K = Krause-Endkörperchen; 1 = Stratum corneum; 2 = Stratum lucidum; 3 = Stratum granulosum; 4 = Stratum germinativum; 5 = Stratum papillare; 6 = Stratum reticulare

Obwohl keine Hautkomponente, wird das subkutane Fettgewebe beim Hautaufbau mit erwähnt, da es eine enge anatomische und funktionelle Beziehung zur Epidermis und Dermis unterhält. So enthält die Subcutis die größeren Blutgefäße und Nerven für die oberen Hautschichten. In der Unterhaut liegen auch Sinneszellen für starke Druckreize.

Die Haut ist ein wichtiges Kontakt- und Sinnesorgan. Sie stellt den sichtbaren Teil des menschlichen Körpers dar und ist ständig wechselnden äußeren Einflüssen wie Sonnen- und thermischer Strahlung, mechanischen, chemischen und biologischen Stimuli und Feuchtigkeitsveränderungen ausgesetzt. Zur Aufrechterhaltung der organischen und damit auch der systemischen Homöostase ist daher die Fähigkeit Signale mit größter Genauigkeit zu erkennen und in adäquater Art und Weise zu verarbeiten erforderlich. Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, muss das entsprechende System weit verbreitet sein, sich effizient selbst regulieren können und in der Lage sein, unwichtige Signale aus der Umwelt von biologisch relevanten Signalen zu unterscheiden. Diese

Aufgabe wird in der Haut durch ein enges Zusammenspiel von Immunsystem, Blutgefäßsystem und Nervensystem gelöst. Das Immunsystem setzt sich aus residenten, rekrutierten und zirkulierenden Zellpopulationen zusammen [3]. Zu den ansässigen Zellen gehören Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen des vaskulären und lymphatischen Systems, Mastzellen, Histiozyten, T-Lymphozyten und dendritische Zellen. Die Population der rekrutierten Zellen beinhaltet Monozyten, basophile, neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie Mastzellen und T- und B-Lymphozyten. Zirkulierende Zellen sind dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und T-Lymphozyten. Die Blutversorgung ist gruppiert in einen superfizialen und einen inferioren Plexus, beide im Stratum retikulare der Dermis gelegen [4]. Die beiden Plexus sind durch kleine Blutgefäße verbunden. Umgeben wird das Gefäßbett von einem lymphatischen Netzwerk. Zum Nervensystem gehört ein Arsenal an unterschiedlichen Typen von Rezeptoren. Dazu zählen Schmerzrezeptoren (bis zu 200/cm^2 Haut), Druckrezeptoren (Vater-Pacini-Körperchen, bis zu 100/cm^2 Haut), Thermorezeptoren (Krause-Körperchen und freie Nervenendigungen), Dehnungsrezeptoren (Ruffini-Körperchen), Tastrezeptoren (Meissner-Körperchen und Merkel-Zellen) und Haarfollikelrezeptoren. Das ausgedehnte neuronale Netzwerk der Haut wird repräsentiert von cholinergen und adrenergen Nerven und durch myelinisierte und unmyelinisierte sensible Nervenfasern [5]. Die autonomen Nerven versorgen Arteriolen, Muskeln des Haarbalges und apokrine und ekkrine Drüsen. Die freien Nervenendigungen der sensiblen Nerven sind entweder umgeben von den zuvor beschriebenen Rezeptoren oder haben direkten Kontakt mit Merkel-Zellen. Weiterhin versorgt ein dichtes Netz sensorischer freier Nervenendigungen Haarfollikel, apokrine und ekkrine Drüsen, die Dermis und die Epidermis. Das sensible und autonome Nervensystem in der Haut zeigt regional Unterschiede die in Beziehung zur Anatomie und zu den Dermatomen stehen. Der Rumpf, die Extremitäten, der Hinterkopf und der Nacken werden von Nerven aus den Spinalganglien versorgt, während Gesicht, ein Großteil des Kopfes und ein Teil des Nackens von Ästen des Nervus trigeminale innerviert werden.

Von Dermatologen wird seit jeher geschätzt, dass die Haut ein komplexes Gewebe ist, welches ein weit entwickeltes neurologisches System mit afferenten Nerven besitzt. Mit diesen sind wir in der Lage die Sensationen Schmerz, Juckreiz, Berührung, Vibration, Hitze und Kälte zu unterscheiden. Weniger bekannt ist die Tatsache, dass dieses sensible System auch efferente Effekte vermittelt. Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass von afferenten Nerven ausgeschüttete Neuropeptide in der Haut fähig sind, spezifische dermale Zielzellen zu aktivieren und so verschiedene inflammatorische Reaktionen auszulösen [6-9]. Hinweise auf die efferente Funktion

der sensiblen Nerven wurden immer wieder gefunden. Beispielsweise wurde beobachtet, dass Patienten mit Sensibilitätsstörungen der Haut keine normale Entzündungsreaktion nach lokaler Applikation von verschiedenen Irritanzien entwickelten [10]. Gleichermaßen wurden bei Patienten mit kongenitalen Analgesiesyndromen, postherpetischer Analgesie und diabetischer Neuropathie fehlerhafte Entzündungsantworten festgestellt [11]. Diese klinischen Beobachtungen gaben Anlass die Rolle des Nervensystems bei der Regulierung von inflammatorischen Reaktionen zu untersuchen. Als Verbindung zwischen dem Nervensystem und den inflammatorischen Prozessen in der Haut wurden bald die Neuropeptide gefunden. In Studien konnte ein Anstieg der Neuropeptide und ihrer Rezeptoren in entzündeten Geweben verzeichnet werden [12,13]. Zusätzlich konnte mit verschiedenen Neuropeptidantagonisten die Entzündungsreaktion bei Tierversuchen vermindert oder inhibiert werden. Rezeptoren für diese Neuropeptide wurden an vielen immunkompetenten Zellen gefunden, die auch bei der Ausbildung einer Inflammation eine große Rolle spielen. Dazu gehören T- und B-Zellen, Monozyten, Leukozyten und Mastzellen [14,15]. Werden diese Zellen Neuropeptiden ausgesetzt, agieren sie selber als aktivierende Effektorzellen und führen zu erhöhten zytotoxischen Aktivitäten, Antikörpersekretion und Cytokinproduktion [16-20]. Auf diese Art und Weise beeinflusst das neurologische System auf sehr direktem Wege die Reaktionen des Immunsystems.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wird angenommen, dass auch bei der Entstehung und Ausprägung von allergischen und entzündlichen Erkrankungen der Haut wie Urtikaria, atopischer Dermatitis, Psoriasis etc. das Nervensystem eine maßgebliche Rolle spielt.

1.1.1 Atopische Dermatitis

Die atopische Dermatitis, auch Neurodermitis genannt, ist eine chronisch-rezidivierende Hauterkrankungen, assoziiert mit dermaler Hyperreaktivität auf verschiedene Umweltfaktoren. Sie gehört wie das allergische Asthma und die allergische Rhinitis zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen und wird vermutlich polygen vererbt. In den Indurstriestaaten ist sie eine weit verbreitete Krankheit, welche häufig Kinder (5-20 %), seltener Erwachsene (1-3 %) betrifft. In den letzten Jahrzehnten kam es zu einem stetigen Anstieg der Prävalenz, das Krankheitsbild wurde im Jahre 2000 2 – 3-mal häufiger diagnostiziert als noch 30 Jahre früher [21].

Hauptsymtome sind vor allem in den Beugen lokalisierte rote, schuppende, manchmal auch nässende Ekzeme auf der Haut und ein starker Juckreiz. Die Erkrankung verläuft schubweise und hat ein individuelles, vom Lebensalter abhängiges Erscheinungsbild [22].

Die Pathogenese der Neurodermitis ist nicht vollständig geklärt und daher Gegenstand intensiver Grundlagenforschung. Derzeit geht man von einem multifaktoriellen Prozess aus, als dessen Auslöser eine Dysregulation des Hautimmunsystems, eine Störung des neurovegetativen Systems sowie Anomalien der epidermalen Hornschicht angenommen werden. Darüber hinaus wird den Neuropeptiden eine wichtige Rolle bei der Entstehung der atopischen Dermatitis zugeschrieben [22].

1.2 Substanz P

1.2.1 Neuropeptide – Verbindung zwischen Immun- und Nervensystem

Neben den klassischen Mediatoren Noradrenalin in postganglionären sympathischen Nervenfasern und Acetylcholin in parasympathischen Nervenfasern, existieren eine Reihe von Neuropeptiden, die ausgeprägte pharmakologische Effekte auf den Muskeltonus der Blutgefäße und der Bronchien, auf die Drüsensekretion und auf Entzündungs- und Immunzellen haben [23]. Diese Neuropeptide können weder ausschließlich als Mediatoren des autonomen noch des sensiblen Nervensystems bezeichnet werden, und werden daher unter dem Begriff des nicht-adrenergen nicht-cholinergen (NANC)-Systems zusammengefasst. Aufgrund physiologischer und pharmakologischer Erkenntnisse können die NANC-Mediatoren in zwei funktionelle Gruppen eingeordnet werden [24]. Die Tachykinine und CGRP (calcitonin gene-related peptide) einerseits gehören zum exitatorischen NANC-System (eNANC) [25,26], NOS (nitric oxide synthase), VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid) und Neuropeptid Y (NPY) andererseits zum inhibitorischen NANC-System (iNANC) [27].

Synthetisiert werden die Neuropeptide in Nervenzellen, vor allem in denen der Spinalganglien. Via axonalem Transport werden sie sowohl zu den Synapsen des Hinterhorns, als auch in die peripheren Nervenendigungen transportiert. Bisher wurden mit immunhistochemischen Methoden in Spinalganglienzellen Tachykinine (Substanz P, Neurokinin A (NKA), Neurokinin B (NKB)), CGRP, Bombesin, Somatostatin, Cholecystokinin (CCK), VIP, Galanin und PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) nachgewiesen [28-30]. Freigesetzt werden die

Neuropeptide aus den Neuronen in bestimmten Kombinationen. So werden aus sensorischen Fasern CGRP, Substanz P und NKA ausgeschüttet, während VIP von parasympathischen Nerven und NPY von sympathischen Nerven freigegeben werden [31].

In der Haut umfassen die Neuropeptide eine große Gruppe regulierender Substanzen, darunter auch Tachykinine, CGRP, Somatostatin, VIP und andere (siehe Tabelle 1). Hier werden sie von sensiblen und autonomen Nervenfasern ausgeschüttet, konnten aber auch in Hautzellen wie Keratinozyten, mikrovaskulären Endothelzellen, Merkelzellen, Fibroblasten, Langerhanszellen, Leukozyten, Eosinophilen, Mastzellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden [4,32-35]. Heute nimmt man an, dass Neuropeptide verschiedene Hautkrankheiten und deren Symptome hervorrufen oder verstärken können. Dazu gehören Urtikaria, Hypersensibilitätssyndrome, Akne rosacea, Pruritus, Psoriasis, atopische Dermatitis, Alopecia areata, Vitiligo, Prurigo nodularis etc. [35,36].

Quelle	**Neuropeptide**
Residente und zirkulierende Zellen in der Haut	Gastrin-releasing Peptid, Somstostatin, NPY, ANP, PHM/PHI, Galanin, Neurokinine, Substanz P, Neurotensin, CGRP, VIP, Bradykinin, CCK, Endotheline, CRH, Urocortin, α-, β-, γ-MSH, ACTH, β-Endorphin, Enkephaline
Nervenendigungen	Substanz P, Neurokinine, Neurotensin, CGRP, VIP, Somatostatin, NPY, ANP, PHM/PHI, Bradykinin, Galanin, CCK, Endotheline, α-, γ-MSH, β-Endorphin, CRH, Urocortin, Dynorphin, Enkephaline

Tabelle 1: Neuropeptide der Haut [4]

1.2.2 Die Familie der Tachykinine

Eine in Nervenfasern der Haut besonders häufig vorkommende Gruppe von Neuropeptiden sind die Tachykinine. Die Familie der Tachykinine besteht aus eng miteinander verwandten Peptiden, deren bekannteste Vertreter Substanz P, NKA und NKB sind. Desweiteren wurden die NKA-Varianten Neuropeptid K und Neuropeptid γ nachgewiesen. Substanz P, NKA, Neuropeptid K und Neuropeptid γ werden alle vom gleichen Gen, dem Präprotachykinin A-Gen (PPT-A-Gen) kodiert [37], während NKB vom Präprotachykinin B-Gen kodiert wird [38]. Zu finden sind die Tachykinine vor allem im Nervensystem. NKB kommt im ZNS und im Rückenmark vor [39-42], während Substanz P und NKA im ZNS und auch in afferenten sensiblen Neuronen, welche verschiedene periphere Gewebe innervieren, nachgewiesen werden konnten [13,43-45]. Viele Jahre

wurde angenommen, dass Tachykinine ausschließlich neurogenen Ursprungs und ihre Hauptquelle capsaicin-sensitive sensible Neurone sind [43,44,46,47]. Es konnten jedoch in der Zwischenzeit auch andere neuronale und nicht-neuronale Quellen in der Peripherie entdeckt werden [48]. So wurde in letzter Zeit in Studien sowohl am Tier als auch am Menschen deutlich, dass Immunzellen eine weitere Quelle für Tachykinine sind. Eine Produktion von Substanz P wurde in Eosinophilen (Maus und Mensch), Mononzyten und Makrophagen (Ratte und Mensch), Lymphozyten (Mensch) und dendritischen Zellen (Maus) nachgewiesen. Inflammatorische Reize wie Lipopolysaccharide konnten die Konzentration der Tachykinine in diesen Zellen erhöhen [49].

In experimentellen Studien an Ratten wurde ermittelt, dass die Freisetzung der Tachykinine aus sensiblen Nerven durch verschiedene Stimuli bewirkt werden kann. Dazu gehören Capsaicin, Elektrostimulation der Nerven, niedriger pH, Formalin, Toluendiisocyanat, Histamin, Bradykinin, Prostaglandine, Leukotriene und Zigarettenrauch [50]. Aber auch eine Selbstregulation ist möglich. So kann Substanz P z.B. die eigene Ausschüttung über die Produktion von Inositol-1,4,5-trisphosphat anregen oder auch durch die Aktivierung eines NK_1-Autorezeptors hemmen [51].

Tachykinine wirken wahrscheinlich als parakrine und endokrine Faktoren und spielen eine Rolle in der Neuroimmunmodulation. Sie gelten als die Hauptmediatoren der neurogenen Entzündung. Während verschiedener inflammatorischer Erkrankungen und Infektionskrankheiten werden sie verstärkt exprimiert [52]. Außerdem konnte ihre Notwendigkeit zur Entwicklung einer Entzündung nach Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen gezeigt werden [53].

Ein Großteil der physiologischen Auswirkungen der Tachykinine werden über die Bindung an einen von drei Tachykininrezeptoren, bezeichnet als NK_1, NK_2 und NK_3, vermittelt. Kürzlich wurde ein weiterer zur Tachykininfamilie zugehöriger Rezeptor entdeckt und NK_4 genannt [54]. Alle vier gehören zur Gruppe der Rhodopsinrezeptoren mit sieben hydrophobischen transmembranären Domänen, verbunden durch extra- und intrazelluläre Schleifen und gekoppelt an G-Proteine (siehe Abbildung 2) [55,56].

Unterschieden werden können sie anhand ihrer molekularen Eigenschaften und ihrer unterschiedlichen pharmakologischen Affinität für die Tachykininliganden [57]. Substanz P aktiviert vor allem den NK1-Rezeptor, NKA den NK2-Rezeptor und NKB vermittelt seine Effekte vermehrt durch den NK3-Rezeptor. Die NK-Rezeptoren sind in nahezu allen Geweben des Körpers

wiederzufinden. In der Haut konnten sie an Keratinozyten, Endothelzellen, Mastzellen, Fibroblasten, Merkelzellen und Langerhanszellen nachgewiesen werden [9,58].

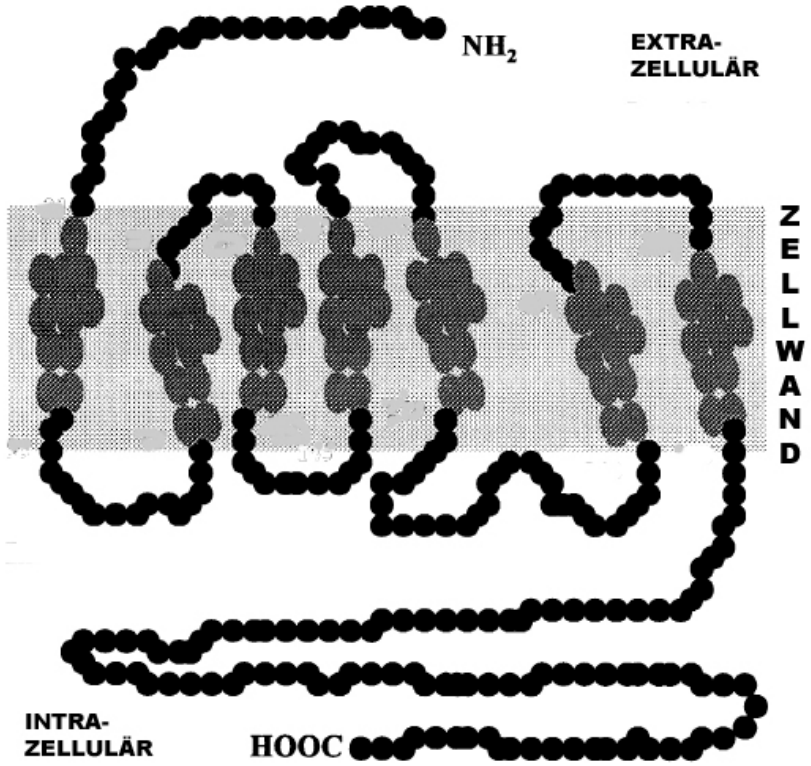

Abbildung 2: Schematische Abbildung des menschlichen NK_1-Rezeptors [59]

Der Tachykininabbau wird hauptsächlich durch zwei Enzyme bewerkstelligt: Neutrale Endopeptidase (NEP) und angiotensin converting enzym (ACE) [60]. Nachgewiesen werden konnte dies in verschiedenen Studien, in denen gezeigt wurde, dass durch Hemmung der NEP-Aktivität eine Steigerung der Entzündungsreaktion erreicht wird [61-63]. In Bezug auf ACE konnte belegt werden, dass bei genetisch veränderten Mäusen mit einer nur heterozygoten Anlage für ACE die Entzündungsreaktion bei atopischer Dermatitis stärker verlief als bei entsprechend homozygoten Mäusen. NEP ist vor allem in den Metabolismus von Tachykininen im Gehirn [64], Rückenmark [65] und peripheren Geweben [60] integriert, während ACE für den Tachykininabbau im Plasma und im Liquor cerebrospinalis [66] verantwortlich ist. Die Funktion von NEP – neben der Aufrechterhaltung der Homöostase in Bezug auf Neuropeptide – ist noch nicht vollständig geklärt. Da jedoch NEP auch Angiotensin und Bradykinin inaktiviert, scheint es physiologischerweise ein wichtiger Faktor für die Regulation des Gefäßtonus zu sein [67].

1.2.3 Substanz P - Vorkommen, Wirkung und Bedeutung

Der wahrscheinlich am besten untersuchte Vertreter der Tachykinine ist Substanz P. In den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts von U.S. von Euler entdeckt [68], erhielt sie ihren Namen von Gaddum und Schild 1934 [69]. Substanz P ist ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid und wird von Nervenzellen, aber auch von Entzündungszellen wie Makrophagen, Eosinophilen, Lymphozyten und dendritischen Zellen gebildet [70]. Nach ihrer Synthese in den Ribosomen [71,72], wird Substanz P in Vesikel verpackt [73,74], um per axonalem Transport zu den Nervenendigungen zu gelangen [75]. Als sensibler Neurotransmitter ist sie zu finden im ZNS und im peripheren Nervensystem und wird sowohl von den zentralen als auch den peripheren Endigungen afferenter Neurone ausgeschüttet [76,77]. Bei genaueren Untersuchungen der Verteilung von Substanz P im peripheren Nervensystem konnte mRNA des PPT-A-Gens im Ganglion nodosum, trigeminale und in den Spinalganglien gefunden werden. Substanz P direkt wurde mit Hilfe von Immunhistochemie im Ganglion trigeminale, in den Spinalganglien und in intrinsischen Neuronen des Darmes nachgewiesen [78-83]. In der Haut wird Substanz P von Nervenfasern ausgeschüttet, die oft in der Nähe von Endothelzellen von Blutgefäßen, Epithelzellen, Mastzellen, Schweißdrüsen, Haarfollikeln und Meissnerschen Tastkörperchen liegen [84], Übersicht siehe [59].

Viele Untersuchungen belegen eine Mitwirkung von Substanz P während Entzündungsreaktionen und Aktivitäten des Immunsystems. So führt Substanz P zu Vasodilatation von postkapillären Venolen und Ödem, was den Entzündungszeichen Rubor und Tumor entspricht [13]. Desweiteren regt Substanz P die Freisetzung von Chemokinen wie Interleukin-8, proinflammatorischen Cytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor α, Histamin, Leukotrien B_4 und Prostaglandin D_2 und E_2 durch Mastzellen, Leukozyten, Lymphozyten und Makrophagen an [58,85]. In aktivierten menschlichen T-Lymphozyten steigert Substanz P die Interleukin-2-Produktion und führt somit zur T-Zell-Proliferation [86]. In dermalen mikrovaskulären Endothelzellen entdeckte man eine durch Substanz P hervorgerufene Induktion der Bildung von Adhäsionsmolekülen wie interzellularem Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und vaskulärem zellulären Adhäsionsmolekül (VCAM-1) und dadurch eine verstärkte Infiltration von Eosinophilen und Neutrophilen [87,88]. In Keratinozyten regt Substanz P die Produktion der proinflammatorischen Cytokine Interleukin-1α, Interleukin-1β und Interleukin-8 an [35,89]. Weiterhin führt Substanz P zur Proliferation von Fibroplasten, Keratinozyten und Endothelzellen und könnte über diesen Mechanismus eine Rolle bei verschiedenen proliferativen Hauterkrankungen spielen.

Auch bei allergischen Hauterkrankungen gibt es weitreichende Hinweise auf eine Mitwirkung von Substanz P. Im Tiermodel zeigte sich eine Beeinflussung von allergischen Hautreaktionen und eine Entstehung von Hypersensibilität durch Substanz P [90]. Belegt werden konnte dies mit Hilfe von Substanz P-Agonisten und –Antagonisten, welche zu einer Verstärkung beziehungsweise Inhibition sowohl der akuten als auch der späten Reaktion auf Allergene führten. Umgekehrt konnte bei allergischen Hauterkrankungen wie z.B. atopischer Dermatitis eine verstärkte Anzahl an Substanz P-exprimierenden Nervenfasern beobachtet werden. Dies erfolgt ursächlich durch einen Anstieg der Tachykinin-produzierenden Nerven und/oder der nichtneuronalen Quellen für Tachykinine. Dabei werden auch Nervenfasern stärkeren Durchmessers integriert, die normalerweise keinen Anteil an der Tachykinin-Produktion haben [91-93]. Einer der bekannten Faktoren für die Erhöhung der Substanz P-Expression ist NGF (nerve growth factor). NGF gehört zur Familie der Neurotrophine, welche das Überleben, die Differenzierung und Erhaltung von Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem kontrollieren. Unter physiologischen Umständen werden Neurotrophine von mit Nerven assoziierten Zellen wie Glia- oder Schwannschen Zellen und von Nervenzellen selbst gebildet, wohingegen während einer Entzündung Neurotrophine auch von Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen und T- und B-Zellen gebildet werden können [94]. Durch die erhöhte Konzentration an Neuropeptiden kommt es zu abnormen Reaktionen auf bestimmte Reize, was gerade Merkmal verschiedener allergischer Erkrankungen ist.

Das Nervensystem ist demnach durch Ausschüttung von Mediatoren wie Substanz P und CGRP an der Ausbildung von allergischen und entzündlichen Erkrankungen beteiligt. Daher werden auch alle Effekte der Tachykinine und weiterer Neuropeptide unter dem Begriff der neurogenen Entzündung zusammengefasst.

1.3 Die neurogene Entzündung

Die neurogene Entzündung ist eine komplexe Antwort des Immunsystems auf schädigend einwirkende Reize. Der inflammatorische Prozess ist das Resultat der Aktivierung von sensiblen Nerven, welche Neuropeptide in verschiedene Gewebe ausschütten. Es gibt inzwischen eine große Anzahl von Krankheiten, für deren Entstehung eine neurogene Komponente angenommen wird, beziehungsweise bekannt ist. Dazu gehören Augeninfektionen mit dem Herpesvirus, entzündliche Darmerkrankungen, Asthma bronchiale und entzündliche Arthritis [9]. Durch die to-

pographische Nähe von kutanen Nerven zu verschiedenen epidermalen und dermalen Effektorzellen [7,95] wird auch von einer direkten Beeinflussung der dermalen Entzündungsreaktion durch die Freisetzung dieser Neuropeptide ausgegangen. Dies gilt vor allem für die Hauterkrankungen Urtikaria, Psoriasis und atopische Dermatitis.

Mit den Mechanismen der neurogenen Entzündung hat man sich in den letzten Jahrzehnten intensiv befasst. Im Laufe der Erforschung wurden der Entzündungsreaktion viele Namen wie Axonreflex, antidrome Vasodilatation, triple response, flare response und dorsal root reflex gegeben. 1876 berichtete Stricker erstmals von einer Erwärmung der Haut nach Stimulation des distalen Endes durchschnittener Hinterhornwurzeln. Er führte diese Vasodilatation allerdings auf eine Stimulation efferenter sympathischer Nerven zurück. 1901 bestätigte Bayliss diese Beobachtungen, schloss jedoch aus seinen Untersuchungen eine Vermittlung der Entzündungsreaktion durch Impulse über afferente Neurone in der der Nervenleitung entgegengesetzten Richtung und prägte den Begriff der antidromen Leitung. Bruce und Breslauer konnten dann mit Hilfe von Senföl als Lokalirritanz die Abhängigkeit der Vasodilatation von der Funktionsfähigkeit und Integrität peripherer afferenter Nerven nachweisen. Trotz dieser Erkenntnisse blieb eine weitere Erforschung des Sachverhaltes aus. Erst durch Nicholas Jancsó wurde 1960 dem Nervensystem wieder eine entscheidende Rolle bei Entzündungsvorgängen zuerkannt und es kam der Begriff „neurogene Entzündung“ in Umlauf. Anfangs wurde er vor allem für die Beschreibung von Plasmaextravasation und Vasodilatation verwendet, heute benutzt man ihn meist als Überbegriff für eine Vasodilatation (Erythem an der Reizstelle), eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und der damit verbundenen Ausbildung eines Ödems [1].

Wie schon angedeutet wird die neurogene Entzündung durch afferente Nerven vermittelt. Dabei handelt es sich um dünnmyelinisierte A-delta-Fasern oder unmyelinisierte C-Fasern, welche in erster Linie für die Konduktion nozizeptiver Informationen zuständig sind. Sie kommen in nahezu allen Geweben des menschlichen Körpers vor, so dass auch die neurogene Entzündung in ganz unterschiedlichen Organen und Gewebsstrukturen auftreten kann. Dazu gehören unter anderem die Haut, die Konjunktiven, die Meningen, das Trommelfell, das Zahnfleisch, die Zunge, die Speicheldrüsen, die Nasenschleimhaut und die Atemwege, der Ösophagus, der Magen, die Gallenblase, die pankreatischen Gänge, die Ureteren und die Harnblase, der weibliche Fortpflanzungstrakt und die Analschleimhaut [96]. Fast alle diese Gewebe sind Oberflächen des Körpers, die mit der äußeren Umwelt in Kontakt stehen und dicht durch sensible Nerven innerviert sind.

Die Vermittlung der neurogenen Entzündung stellt man sich heute wie folgt vor (siehe auch Abbildung 3): Durch Reize noxischer Intensität z.B. physikalische Reize (thermische, mechanische und elektrische), UV-Strahlung, chemische Substanzen wie Capsaicin, Senföl, Xylene [30,97,98], Formalin, Toluendiisocyanat, Zigarettenrauch [50] sowie endogene Faktoren wie Protonen (niedriger pH-Wert), Hormone, Cytokine, Proteinasen, Bradykinin, Histamin, Prostaglandine etc. [35,99] werden die sensiblen Nervenendigungen aktiviert. Es kommt zu einer orthodromen Weiterleitung des Signals an die Spinalganglien und ins ZNS. Dieses Signal überträgt die Schmerzinformation. Gleichzeitig führt der noxische Reiz zu einer antidromen Nervenstimulation und damit zur Freisetzung von Neuropeptiden aus den Nervenendigungen an der Reizstelle. Zusätzlich können die durch die Noxe ausgelösten Aktionspotentiale auch an Abzweigungen von Axonkollateralen wieder in die antidrome Richtung weitergeleitet werden und führen zu einer direkten Ausschüttung von Neuropeptiden aus den Nervenendigungen außerhalb der Reizstelle aber innerhalb des Innervationsgebietes des gereizten Nerven. Dieser zuletzt beschriebene Weg wird auch als Axonreflex beziehungsweise seine Auswirkung als flare response bezeichnet [1,99].

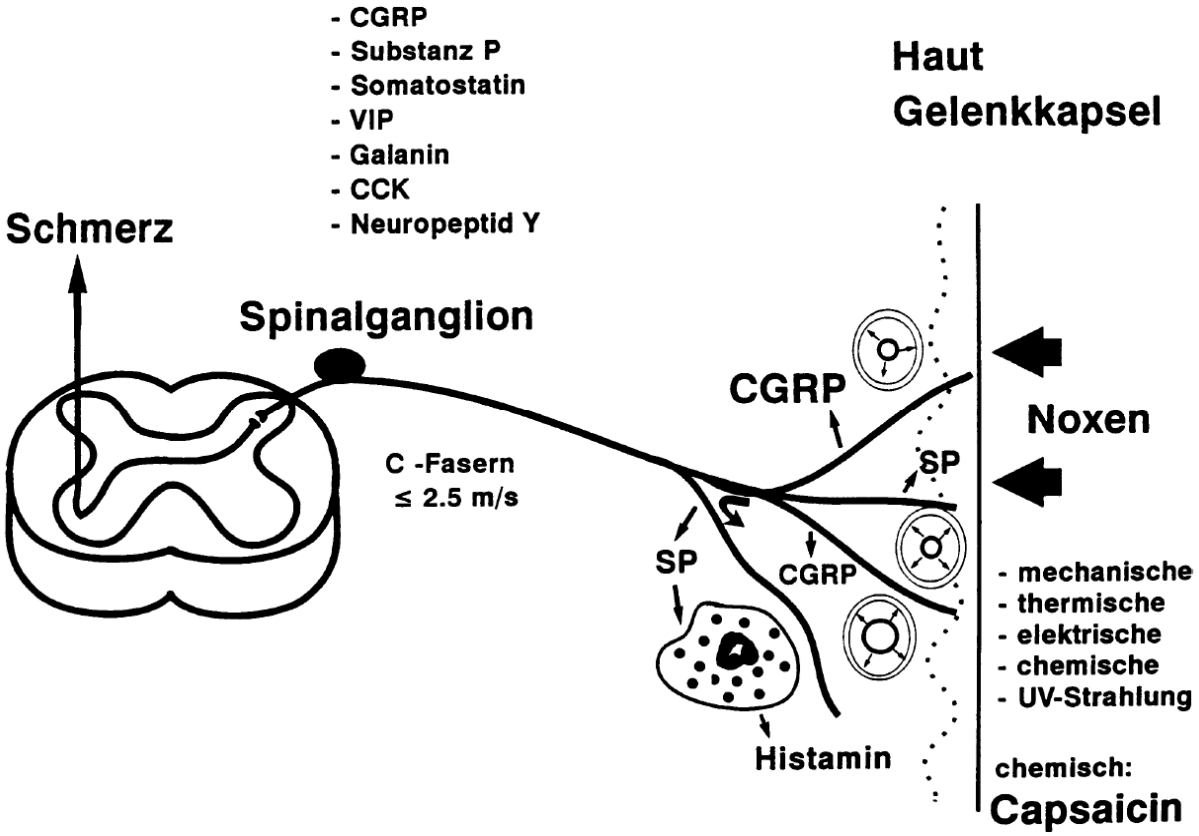

Abbildung 3: Schema der neurogenen Entzündung [1]

Neueste Untersuchungen belegen, dass die Aktionspotentiale nach Umschaltung über Interneurone auf spinaler Ebene auch zu einer Freisetzung von Neuropeptiden außerhalb des Innervationsareals führen [100,101].

Die freigesetzten Neuropeptide rufen direkt oder durch Freisetzung sekundärer Mediatoren wie z.B. Histamin aus Mastzellen die neurogene Entzündung hervor. Zu den Symptomen gehören wie bei jeder Form von Entzündung Rötung, Schwellung, Erwärmung und Schmerz. Die Sensation des Schmerzes wird direkt durch die Reizung der afferenten Nerven hervorgerufen. Die drei anderen Krankheitszeichen werden durch Veränderungen am Blutgefäßsystem verursacht. So kommt es einerseits durch Vasodilatation zu erhöhtem Blutfluss, Hyperämie und Rötung, andererseits durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität zu Plasmaextravasation und Ödem. Obwohl sowohl die Vasodilatation, als auch die erhöhte Gefäßpermeabilität auf Modifizierungen am gleichen Organsystem zurückzuführen sind, sind es doch zwei einzeln zu betrachtende Phänomene [97]. Der erhöhte Blutfluss und die Hyperämie entstehen durch die Dilatation von Arteriolen, vermittelt durch die Stimulation unmyelinisierter C-Fasern und einiger dünnmyelinisierter A-delta-Fasern. Die Extravasation von Proteinen hingegen tritt an postkapillären Venolen auf und wird nur durch die Aktivierung von C-Fasern vermittelt. Auch die auslösenden Neuropeptide sind zu unterscheiden. Substanz P und CGRP gelten nach übereinstimmenden Meinungen als die Hauptmediatoren bei der Entstehung der neurogenen Entzündung [1,30]. Hierbei gilt CGRP als der vornehmliche Mediator für die Vasodilatation (die durch Substanz P hervorgerufene Vasodilatation ist schwächer und hält weniger lang an) [102,103], während Substanz P für die Plasmaextravasation verantwortlich ist [76]. Es wird angenommen, dass die frühe Phase der Extravasation durch direkte Wirkung von Substanz P ausgelöst wird, wohingegen in der späten Phase auch sekundär freigesetzte Mediatoren, wie Histamin, Serotonin, Prostaglandine, Leukotriene und andere Mastzellmediatoren wirksam sind [1,30].

Wenn man den Begriff der neurogenen Entzündung etwas weiter fasst als Jancsó es getan hat, gehören auch alle Effekte der Neuropeptide außerhalb des Gefäßsystems dazu. Diese sind von Organ zu Organ unterschiedlich. Am Herzen wirkt CGRP positiv chronotrop, in der Harnblase führt es zur Relaxation der Muskulatur. Durch Substanz P und NKA kommt es zur Kontraktion verschiedener glatter Muskeln (M. sphincter pupillae, Ureter-, Harnblasen- und Urethramuskulatur), zur Sekretion exokriner Drüsen etc. Anhand der Wirkung am Bronchialsystem ist die starke Speziesabhängigkeit der Effekte der Neuropeptide nach zu vollziehen. Während durch Depolari-

sation von afferenten Nerven im Meerschwein direkt eine Bronchokonstriktion ausgelöst wird, führt der gleiche Impuls bei Mäusen und Ratten indirekt zur Bronchodilatation. Beim Menschen wird eine starke Bronchokonstriktion hervorgerufen [104]. Dies macht deutlich, dass die neurogene Entzündung ein großes Feld an Symptomen abdeckt, und dass Ergebnisse aus Tierversuchen nicht einfach auf den Menschen übertragen werden können.

1.4 Capsaicin – ein Auslöser der neurogenen Entzündung

Wie schon beschrieben, führen Reize noxischer Intensität zur Aktivierung sensibler Nervenendigungen und so zur neurogenen Entzündung. Seit den Erstbeschreibungen werden daher bis heute chemische Substanzen, wie Capsaicin, Senföl und Xylene zur Induktion von neurogenen Entzündungen eingesetzt. Vor allem die neusynthetisierten Vanilloidanaloga haben das pharmakologische Repertoire zu ihrer Erforschung wesentlich bereichert.

Das in der Pepperoni vorkommende Capsaicin (8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid), ein Derivat der Homovanillinsäure, wurde durch die spezifisch exzitatorische und bei längerer Anwendung desensibilisierende Wirkung auf dünne afferente Nervenfasern zur wichtigsten Substanz in der Erforschung neurogener Entzündungen und der sie auslösenden nozizeptiven Afferenzen. Exzitatorische Wirkungen treten nach Anwendung von Capsaicin unter anderem an der Haut und der Schleimhaut, am Kniegelenk, am Auge und an den Atemwegen auf [105-109]. Diese beruhen auf der selektiven Erregung einer Untergruppe somatoviszeraler Afferenzen mit unmyelinisierten und in geringerem Maße dünnmyelinisierten Axonen, welche auch die neurogene Entzündung durch Entleerung von Neuropeptiden aus ihren Speichervesikeln vermitteln. Die Aktivierung von dünnmyelinisierten A-delta-Afferenzen durch Capsaicin konnte jedoch nicht generell bestätigt werden, je nach Gewebe gab es speziesabhängige Unterschiede. Die Erregbarkeit polymodaler nozizeptiver C-Fasern durch Capsaicin in der Haut war bei allen bisher getesteten Säugern nachweisbar. Andere C-Fasertypen, wie C-Mechanorezeptoren oder kältesensitive Thermorezeptoren hingegen werden durch Capsaicin nicht erregt. In vitro-Untersuchungen bestätigten, dass Capsaicin nur auf eine Subpopulation von afferenten C-Fasern exzitatorisch wirkt. Die selektive Wirkung auf polymodal nozizeptive C-Fasern hat dazu geführt, dass zur Charakterisierung dieser Afferenzen oft das Synonym Capsaicin-sensitive Afferenzen verwendet wird [110], Übersicht bei [109].

Die Wirkung von Capsaicin ist abhängig von der Art und Dauer der Applikation. So wirkt es nicht nur, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, exzitatorisch auf afferente Nervenfasern und induziert die neurogene Entzündung, sondern hat umgekehrt auch eine inhibitorische Wirkung. Die lokale Applikation von hochdosiertem Capsaicin an peripheren Nerven führt zu einer Depolarisation und innerhalb von Minuten einer nahezu vollständigen Blockade der Nervenleitung von vor allem C-Fasern. Die systemische Applikation hoher Dosen von Capsaicin bewirkt bei Versuchen mit Ratten eine Reduktion der Anzahl peripherer C-Fasern, bei neugeborenen Ratten sogar eine Degeneration und Reduktion auch dünnmyelinisierter Fasern [13,111,112]. Dies führt sowohl bei den neugeborenen als auch bei den erwachsenen Ratten zu Veränderungen bei nozizeptiven Reaktionen und zur Reduktion des Ausmaßes neurogener Entzündungen [113]. Verantwortlich für die Degeneration wird unter anderem die Blockade des retrograden axonalen Transportes einiger Makromoleküle, wie z.B. NGF, durch Capsaicin gemacht [114,115]. Wie bereits erwähnt, ist NGF sowohl für die Differenzierung als auch das Überleben von Neuronen von essentieller Bedeutung. Die Unterbrechung des NGF-Signales an den Zellkörper könnte daher, wenn auch nicht ausschließlich, die Neurotoxizität von Vanilloiden erklären [116]. Die wiederholte lokale Anwendung von Capsaicin führt zu einer zunehmenden Desensibilisierung der Substanz gegenüber, das heißt das Ausmaß der Capsaicin bedingten Vasodilatation, die Permeabilitätssteigerung und die sensorischen Empfindungen Schmerz und Brennen nehmen sukzessive ab, bis keine Reaktion mehr auftritt [43,109,117]. Dieses Phänomen lässt sich durch Desensibilisierung des später noch beschriebenen Capsaicin-Rezeptors $TRPV_1$ erklären, das heißt einer Veränderung der Kinetik von $TRPV_1$, die offenbar nicht nur durch einen einzelnen Vorgang bedingt ist. Ursächlich könnte eine durch die Agonistenbindung induzierte Konformationsänderung des Rezeptors sein, die zum Verschluss der Kanalpore führt [116]. An der durch Capsaicin desensibilisierten Haut lassen sich dann auch durch Hitzereize, elektrische Stimulation oder chemische Substanzen, wie Histamin und Bradykinin keine neurogenen Reaktionen mehr auslösen [13,109,118].

Diese desensibilisierende Wirkung von Capsaicin wird experimentell, diagnostisch und therapeutisch genutzt. So zeigt das Ausbleiben einer Reaktion auf einen bestimmten Reiz nach Capsaicinvorbehandlung, dass diese Antwort normalerweise neurogen durch Capsaicin-sensitive Afferenzen vermittelt wird, was die Capsaicindesensibilisierung für entsprechende Fragestellungen in der experimentellen Forschung zu einem Standardverfahren machte. Im therapeutischen Bereich fand Capsaicin Gebrauch als eine Art frühes Analgetikum [119] und erlebt in dieser Funktion

derzeit eine gewisse Renaissance in der Behandlung schmerzhafter Zustände wie bei Neuropathien oder bei der rheumatoiden Arthritis [120].

1.5 Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ($TRPV_1$)

Lange blieb unbekannt, auf welche Art und Weise Capsaicin die Ausschüttung von Neuropeptiden aus afferenten Nervenfasern bewirkte. Es wurde angenommen, dass es einen speziellen „Capsaicin-Rezeptor“ geben muss. Untermauert werden konnte dies durch die Entwicklung des Capsaicinantagonisten Capsazepin [121]. Der Beweis für die These kam 1997, als der Capsaicin-Rezeptor von Caterina et al. geklont werden konnte [122]. Zunächst unter dem Namen Vanilloidrezeptor Typ1 (VR_1) bekannt gemacht, wurde er nach der Entdeckung von weiteren der Familie der „transient receptor potential“ (TRP) zugehörigen Ionenkanälen in $TRPV_1$ umbenannt [123].

Die Familie der TRP stellt derzeit einen großen Schwerpunkt in der medizinischen Forschung aufgrund ihrer weiten Verbreitung in verschiedenen Geweben und Organen und ihrer vielen aktivierenden Stimuli dar. TRPs sind Rezeptoren mit sechs transmembranären Domänen, die sich zu Tetrameren zusammenfügen und so für Kationen durchlässige Poren bilden (siehe Abbildung 4).

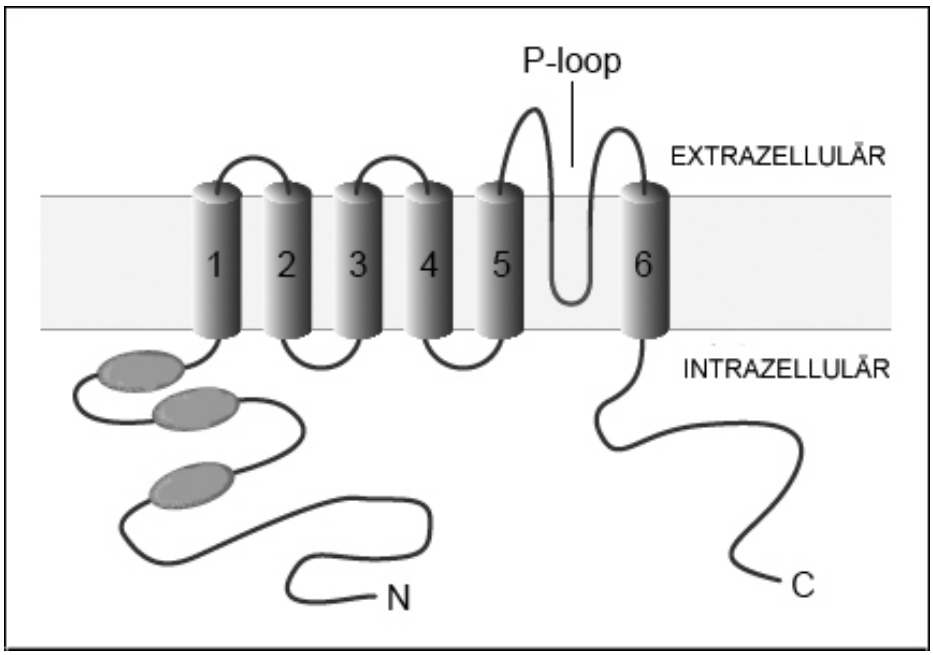

Abbildung 4: Schematische Darstellung von $TRPV_1$ [124]

Der Rezeptor $TRPV_1$ ist ein Polypeptid bestehend aus 838 Aminosäuren, welche 6 transmembranäre Domänen und für Kationen durchlässige Poren (P-loop) bilden.

Die TRPs unterteilte man ursprünglich in 3 Unterklassen: TRPC, TRPM und TRPV (V wie Vanilloid) [125,126]. Später konnten TRPP, TRPML und TRPN als weitere Subtypen hinzugefügt werden. Und kürzlich wurde $ANKTM_1$ beziehungsweise $TRPA_1$, ein weiterer TRP-ähnlicher Kanal, welcher durch niedrige Temperaturen (<15°C) aktiviert wird, entdeckt und geklont [127]. Unsicherheit herrscht noch immer über die genauen Aufgaben der Rezeptorenfamilie. Aufgrund ihres Vorkommens in der Plasmamembran von Neuronen und anderen Zellen und ihrer Überfülle an Aktivatoren hält man sie für Sensoren von chemischen und physikalischen Reizen. Wahrscheinlich durch die TRP-Kanäle sind Säugetiere und Menschen unter anderem in der Lage zwischen süß und bitter, Wärme, Hitze und Kälte zu unterscheiden.

1.6 Fragestellung

Ein Weg für die Induktion der neurogenen Entzündung ist die Aktivierung des $TRPV_1$ an sensiblen Nerven durch Capsaicin oder andere Stimuli. Die damit verbundene Depolarisierung peripherer sensorischer Nervenendigungen führt zur Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide wie Substanz P und CGRP [13]. Wird hingegen ein $TRPV_1$-Antagonist wie Capsazepin verabreicht, ist die Freisetzung von Substanz P stark vermindert [128-130]. Dies bestätigt die Vermutung, dass unter anderem $TRPV_1$ für die Sekretion von Substanz P verantwortlich ist.

In verschiedenen Studien konnte weiterhin gezeigt werden, dass $TRPV_1$-positive Nervenfasern meist auch Substanz P enthalten und andersherum, teilweise konnte eine totale Co-Lokalisation nachgewiesen werden [131-133]. Diese enge anatomische Beziehung zwischen Substanz P und $TRPV_1$ lässt eine weiterreichende Beeinflussung des Substanz P-Metabolismus als nur die Auslösung der Sekretion des Neuropeptides durch den Capsaicinrezeptor vermuten. Zusätzlich weist der Nachweis der weiten Verbreitung von $TRPV_1$ in der Haut [134] auf eine entscheidende Rolle des Rezeptors an entzündlichen Hauterkrankungen hin und gibt Anlass zur weiteren detaillierten Forschung in dieser Richtung.

Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von $TRPV_1$ auf die Expression von Substanz P zu untersuchen. Dabei soll sich auf eine vorangegangene Studie bezogen werden, in der bereits Aussagen über die Substanz P-Expression in Spinalganglien von Mäusen mit atopischer Dermatitis gegenüber gesunden Mäusen getroffen wurde. Hier zeigten die zuvor mit Ovalbumin sensibilisierten Tiere einen deutlichen Anstieg von Substanz P in den die Haut versorgenden Ganglienzellen im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren (noch nicht publizierte Vorstudie der Forschergruppe klinische Allergologie).

Die Hypothese dieser Arbeit lautet nun: Die verstärkte Substanz P-Expression nach Sensibilisierung wird durch $TRPV_1$ vermittelt. Um diese Aussage zu überprüfen wird die Substanz P-Expression in den Spinalganglien von $TRPV_1$–knockout Mäusen nach Sensibilisierung untersucht und mit den Ergebnissen von unbehandelten $TRPV_1$–knockout Tieren verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden insgesamt 15 sechs bis acht Wochen alte Mäuse männlichen Geschlechts vom Stamm C57 BL/6 verwendet. Besonderes Merkmal der Tiere war die Ausschaltung des $TRPV_1$-Gens, was durch Paarung heterozygoter Mäuse ($TRPV_1$ +/-) erreicht wurde. Die TRPV1-knockout Mutante stammt aus dem Jackson Lab (USA), Import über Charles River, und wurde für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Durch Eigenzucht im Campus Benjamin Franklin der Charité Berlin konnten deren Würfe für weitere Untersuchungen genutzt werden (Tierversuchsgenehmigung Reg 0053/01). Die Tiere wurden in einem 12-Stunden hell-dunkel Zyklus und in spezieller pathogenfreier Umgebung gehalten. Die Ernährung erfolgte durch frei zugängliches Labor Standard Futter. Die Versuche (Vorbehandlung, Tötung und Gewebeentnahme) fanden in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikum der Charité Berlin statt.

Die Einteilung erfolgte in drei Gruppen à fünf Tiere, wobei eine Durchnummerierung der Mäuse erfolgte. Die Tiere der Gruppe 1 erhielten die Nummern 1-5, die Tiere der Gruppe 2 die Nummern 6-10 und die Tiere der Gruppe 3 die Nummern 11-15. Gruppe 1 wurde sensibilisiert und zusätzlich retrograd neuronal markiert (Tracing). Gruppe 2 fungierte als Kontrollgruppe und erhielt an den Tagen der intraperitonealen Sensibilisierung eine Scheinbehandlung. Das Tracing wurde auch bei Gruppe 2 durchgeführt. Gruppe 3 wurde wie Gruppe 1 sensibilisiert, eine retrograde neuronale Markierung fand jedoch nicht statt, um Einflüsse durch den verabreichten Farbstoff ausschließen zu können (Übersicht siehe Tabelle 2).

Gruppe	**Sensibilisierung**	**Kontrolle**	**Tracing**
1 (n=5)	+		+
2 (n=5)		+	+
3 (n=5)	+		

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

2.2 Sensibilisierung

Sensibilisierung

Den Gruppen 1 und 3 wurden zur Sensibilisierung am Tag 1, 14 und 21 des Protokolls (siehe Abbildung 5) 200 µl eines Gemisches bestehend aus 100 µl Ovalbumin (OVA) (Ovalbumin VI, 20 µg in 100 µl PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)) emulgiert in 100 µl Aluminium-Hydroxid (AlOH) (Imject Alum, 1,3 mg in 100 µl PBS), einem unspezifischen Immunstimulanz, intraperitoneal injiziert. Die Provokation (Challenge) wurde am Tag 27 des Protokolls durchgeführt. Dazu wurde den Mäusen im linken Schulterbereich zweimal 50 µl Ovalbumin subkutan verabreicht.

Kontrollgruppe

Gruppe 2, welche als Kontrollgruppe fungierte, wurde an den Tagen 1, 14 und 21 des Protokolls 100 µl des Trägerstoffes PBS, versetzt mit 1,3 mg AlOH wie für Gruppe 1 und 3, jedoch ohne Ovalbumin, intraperitoneal injiziert. Am Tag der Provokation (Tag 27) erfolgte ebenfalls im linken Schulterbereich wie bei den Tieren der Gruppe 1 und 3 die Injektion von zweimal 50 µl Ovalbumin.

Retrograde neuronale Markierung (Tracing)

Am Tag 21 wurde neben der intraperitonealen Behandlung auch die retrograde neuronale Markierung durchgeführt. In Vorbereitung dazu wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketaminhydrochlorid (10 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg Körpergewicht) analgesiert. Im Anschluß erfolgte die zweimalige, subkutane Injektion von jeweils 4 µl des Farbstoffes Fluorogold (FG) (2 %ige wässrige Lösung mit 1 % DMSO (Dimethylsulfoxid)) im linken Schulterbereich.

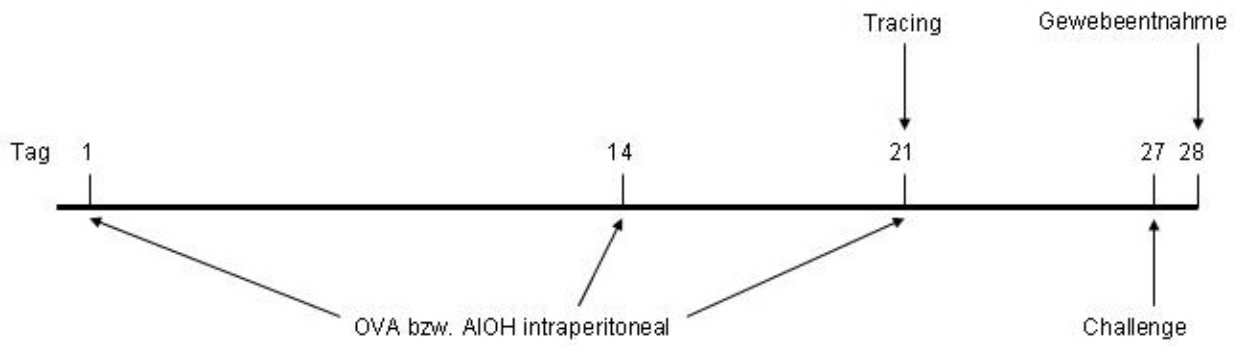

Abbildung 5: Sensibilisierungsschema

2.3 Gewebeentnahme und –bearbeitung

Am Tag 28 des Protokolls wurden die Mäuse mit Ketaminhydrochlorid betäubt. Nach einem kurzen Intervall wurde das Herz durch einen medialen Längsschnitt von ventral freigelegt um zur Optimierung der Fixierung und Erleichterung der späteren Bearbeitung Zambonilösung (2 % Paraformaldehyd, 15 % gesättigte Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PP), pH 7,4) in den rechten Vorhof und weiter durch den Kreislauf zu perfundieren. Daraufhin wurden den Tieren die Spinalganglien Th1-5 jeweils linksseitig entnommen. Weiterhin wurde die Haut nach Rasur im linken Schulterbereich für die weitere Bearbeitung abgetrennt. Alle Gewebeproben wurden in Zambonilösung für ca. 24 Stunden, abhängig von der Gewebegröße, immersionsfixiert, um die unmittelbar nach der Entnahme einsetzende Autolyse beziehungsweise Heterolyse des Gewebes aufzuhalten. 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. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gewebe mit Tissue Tek (OCT) auf Filterpapier aufgebracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80° C aufbewahrt. Von den gefrorenen Ganglien wurden bei –25° C in einem Kryostaten (Leica, CM1900, Bensheim, Deutschland) 6 µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf beschichtete SuperFrost Plus-Objektträger (Teningen, Deutschland) übertragen. Mit dem gleichen Verfahren wurden von der Haut bei –30° C 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Bis zur Bearbeitung mit immunhistochemischen Methoden wurden die Objektträger bei –20° C aufbewahrt.

2.4 Immunhistochemie - Doppelimmunfluoreszenz

Prinzip

Grundprinzip der Immunhistochemie ist die Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Antikörper werden an das jeweilige Protein, für welches sie eine hohe Affinität und Spezifität aufweisen, gekoppelt. Bei der in dieser Arbeit verwendeten indirekten Methode, erfolgt in einem zweiten Schritt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Der Sekundärantikörper trägt einen Fluoreszenz-Farbstoff, der bei Betrachtung unter dem Mikroskop angeregt wird und so das gesuchte Protein sichtbar werden lässt. Bei der Doppelimmunfluoreszenz erfolgt auf die gleiche Weise die Detektion eines zweiten Proteins. Hierfür wird derselbe Gewebeschnitt gleichzeitig bei oben beschriebenen Verfahren mit einem weiteren Primär- und Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einem ande-

ren Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt und kann wieder unter dem Fluoreszenzmikroskop angeregt und so sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, eine Co-Lokalisation von verschiedenen Proteinen nachzuweisen.

Verfahren

In dieser Arbeit erfolgt die Anfärbung von PGP (protein gene product) zur Identifizierung von Nervengewebe und von Substanz P. Das durch retrograde neuronale Markierung gefärbte Gewebe musste wegen der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes Fluorogold bei der Bearbeitung vor Lichteinfall geschützt werden. Nach Entnahme aus dem Gefrierschrank mussten die Objektträger 30-60 Minuten bei Raumtemperatur auftauen und wurden zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit einer Blocklösung aus 5 prozentigem Skim Milchpulver (Biochemika Fluka Chemie GmbH Steinheim) eine Stunde vorinkubiert. Nach Entfernung der Blocklösung wurden die Primärantikörper gegen PGP und Substanz P in ihren entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 3) mit einer Inkubationslösung (PBS mit doppelter NaCl-Konzentration) aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je fünf Minuten) mit PBS wurden zur Detektion der Primärantikörper die entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3) für zwei Stunden aufgetragen. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Schnitte in gepuffertem Glycerol eingedeckt.

	primärer Antikörper	**Verdünnung**	**sekundärer Antikörper**	**Verdünnung**
zum Nachweis von Substanz P	monoklonaler Anti-SP-Antikörper, Rat (Chemicon, USA)	1:450	Cy™3-konjugiertes AffiniPure Donkey Anti-Rat-IgG (H+L) (ImmunoResearch, USA)	1:200
zum Nachweis von PGP	polyklonaler Anti-Protein-Gene-Product-Antikörper, Rabbit (Chemicon, USA)	1:3000	Cy™2-konjugiertes AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (ImmunoResearch, USA)	1 :100

Tabelle 3: Bezeichnung und Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper

Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Diese ist ein Verfahren zur Sichtbarmachung fluoreszierender, beziehungsweise fluorochromisierter Objekte. Durch Bestrahlung der behandelten Gewebeschnitte mit kurzwelligem oder UV-Licht werden die im Farbstoff enthaltenen Fluorochrome angeregt und strahlen daraufhin Licht längerer Wellenlänge ab. Nach Abfilterung des anregenden Lichts durch speziell abgestimmte Sperrfilter, leuchten die Fluoroch-

rome auf dunklem Hintergrund. Für diese Arbeit wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Leica, DMRA2, Bensheim, Deutschland) mit folgenden Filtern verwendet (siehe Tabelle 4):

Fluorochrom	**Filter**	**Erregerfilter**	**Sperrfilter**
Cy2 (für PGP)	FITC	455-490 nm	515-560 mn
Cy3 (für Substanz P)	Cy3	546 nm	590 nm
Fluorogold	Modul U1	330-380 nm	418 nm

Tabelle 4: verwendete Erreger- und Sperrfilter

Zur Auszählung der angefärbten Zellen, wurden jeweils 15-25 Schnitte pro Ganglion ausgewertet, in dem zuerst die Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion (jede durch PGP angefärbte Zelle) und dann die Zahl der Substanz P-positiven Neurone festgestellt wurde. Zuletzt wurden die mit dem Farbstoff Fluorogold angefärbten Neurone ausgezählt und zusätzlich diejenigen, die sowohl unter dem Filter für Fluorogold als auch dem für Substanz P fluoreszierten.

Die Gewebeschnitte der Haut wurden mit dem gleichen Verfahren wie die Ganglien angefärbt, so dass ein Vorhandensein von Substanz P-positiven Nervenfasern in der Haut unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden konnte.

2.5 HE-Färbung

Zur Sichtbarmachung von Immunzellen in der Haut wurde an aus jeder Gruppe exemplarisch ausgewählten Gewebeschnitten der Haut eine HE-(HämatoxylinEosin) Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Objektträger nach dem Auftauen jeweils drei Minuten in immer geringer konzentriertes Ethanol getaucht, beginnend mit 96 prozentigem Ethanol über 80 und 70 zu 50 prozentigem. Nach fünf Minuten in destilliertem Wasser erfolgte die Färbung für zehn Sekunden in Hämatoxylin und 90 Sekunden in Eosin. Darauf folgte die Wiederhohlung der vor der Färbung durchgeführten Schritte noch einmal in umgekehrter Reihenfolge: Verbringen der Objektträger für fünf Minuten in destilliertem Wasser, dann jeweils drei Minuten in 50, 70, 80 und 96 prozentigem Ethanol. Danach wurden die Objektträger weitere 3 Minuten in Xylol getaucht. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Schnitte mittels Vitro-Clud (Emmendingen Deutschland) und die Lagerung bei –20° C bis zur Auswertung. Unter dem Lichtmikroskop konnten die Schnitte nun auf Ansammlungen von Entzündungszellen untersucht werden.

2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde der t-Test verwendet. Bei $p < 0,05$ wurde der Unterschied als signifikant gewertet. Als Streumaß der Werte wurde der Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (SEM) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung

Untersucht wurden die thorakalen Spinalganglien eins bis fünf (Th1 – Th5) der linken Seite von allen 15 Tieren. Von jedem Ganglion wurden 15-25 Querschnitte ausgewertet. Gezählt wurden die angeschnittenen Neurone unter drei verschiedenen Filtern (siehe Tabelle 4 in Kapitel 2.4). Begonnen wurde hierbei mit der Bestimmung der Gesamtzahl an Neuronen pro Ganglion, zu erkennen an ihrer PGP-Immunreaktivität (siehe Abbildung 6). Dabei lag die Anzahl der Neurone bei einem Großteil der untersuchten Schnitte zwischen 100 und 200. Die Schwankungen fanden sich dabei nicht beim Vergleich der Querschnitte eines einzelnen Ganglions, sondern traten vielmehr zwischen den verschiedenen Ganglien auf. Gewebeschnitte mit einer Anzahl von weniger als 30 Neuronen wurden nicht mit in die Statistik aufgenommen.

Unter einem zweiten Filter wurde die Anzahl der Substanz P-positiven Neurone nach Anfärbung von Substanz P ausgezählt (siehe Abbildung 7). Und unter einem weiteren Filter konnten die mit dem Farbstoff Fluorogold markierten Neurone wegen dessen fluoreszierender Eigenschaft sichtbar gemacht und bestimmt werden (siehe Abbildung 8). Somit konnte abschließend die Anzahl der sowohl Substanz P- als auch Fluorgold-positiven Neurone bestimmt werden (durch Pfeile in Abbildung 7 und 8 markiert).

Aus den erhaltenen Daten wurde für jeden Querschnitt der Anteil der Substanz P-positiven Neurone an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion ermittelt. Hieraus konnte der Mittelwert dessen für jedes Ganglion, für das ganze Tier, sowie für die topografisch identischen Ganglien einer Gruppe (beispielsweise aller Th1) berechnet werden. Ebenso wurde der Wert für den Anteil der Fluorogold-positiven Neurone an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion bestimmt. Nach Errechnung des Anteils der sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone an der Anzahl der Fluorogold-positiven Neurone wurde wieder der Mittelwert dessen für jedes Ganglion, für jedes Tier und für jeweils die topografisch identischen Ganglien einer Gruppe erhoben.

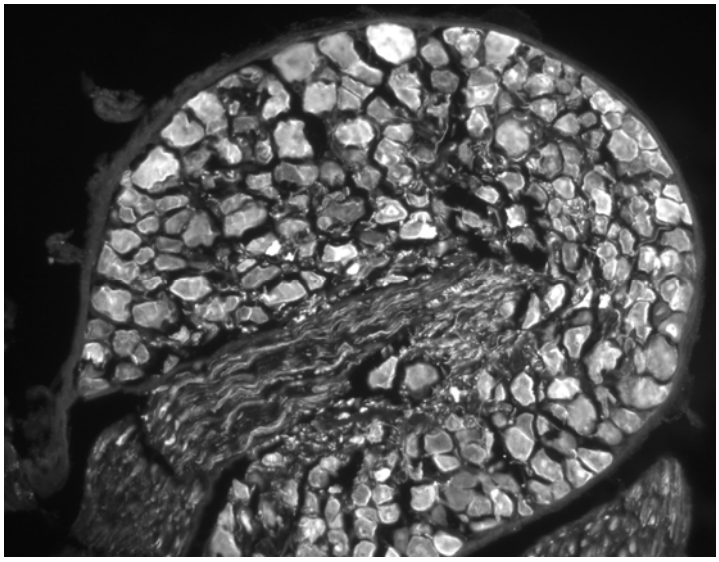

Abbildung 6: PGP-positive Neurone

Querschnitt eines Ganglions unter dem Filter für PGP zur Identifizierung aller Neurone (150)

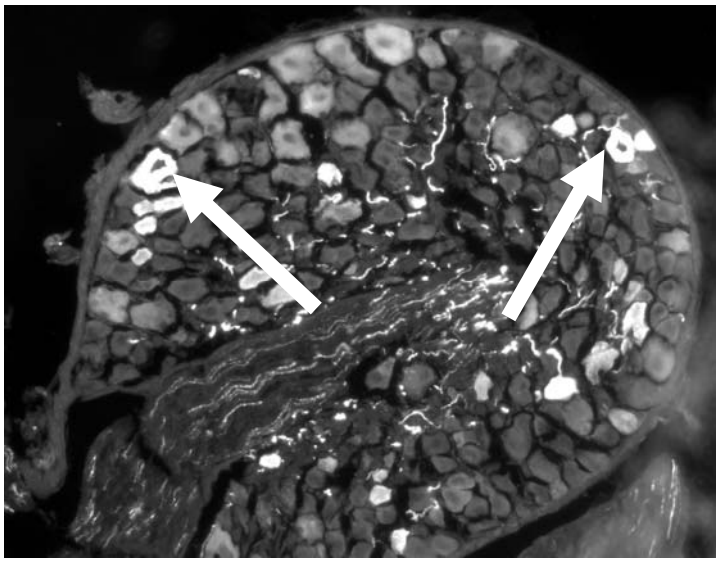

Abbildung 7: SP-positive Neurone

Querschnitt eines Ganglions unter dem Filter für Substanz P (10). Die Pfeile markieren die sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone, also Zellen mit Substanz P-Immunreaktivität von Nervenfasern welche das behandelte Hautsegment versorgen.

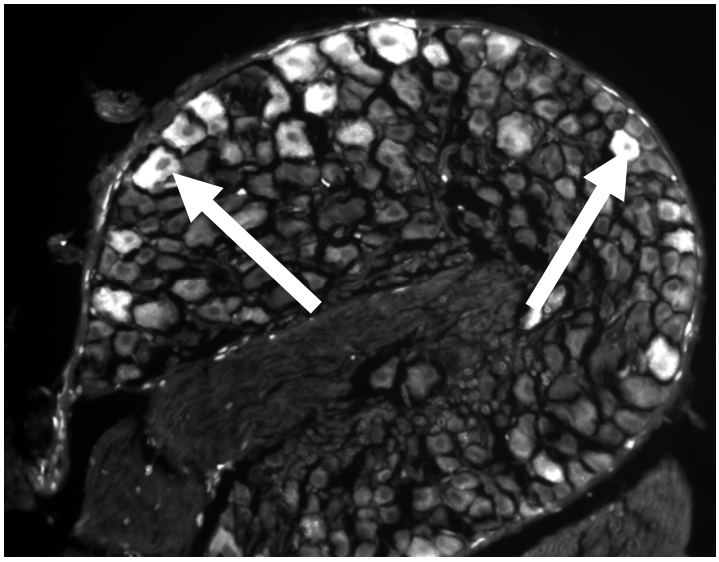

Abbildung 8: FG-positive Neurone

Querschnitt eines Ganglions unter dem Filter für Fluorogold zur Identifizierung der retrograd markierten Neurone (20). Die Pfeile markieren die sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone.

3.2 Substanz P

3.2.1 Injektionsstelle Haut

Durch Doppelimmunhistochemie für PGP und Substanz P konnte gezeigt werden, dass in der behandelten Haut tatsächlich auch Substanz P-haltige Nervenfasern zu finden sind. In Abbildung 9 ist ein entsprechender Hautquerschnitt zu sehen.

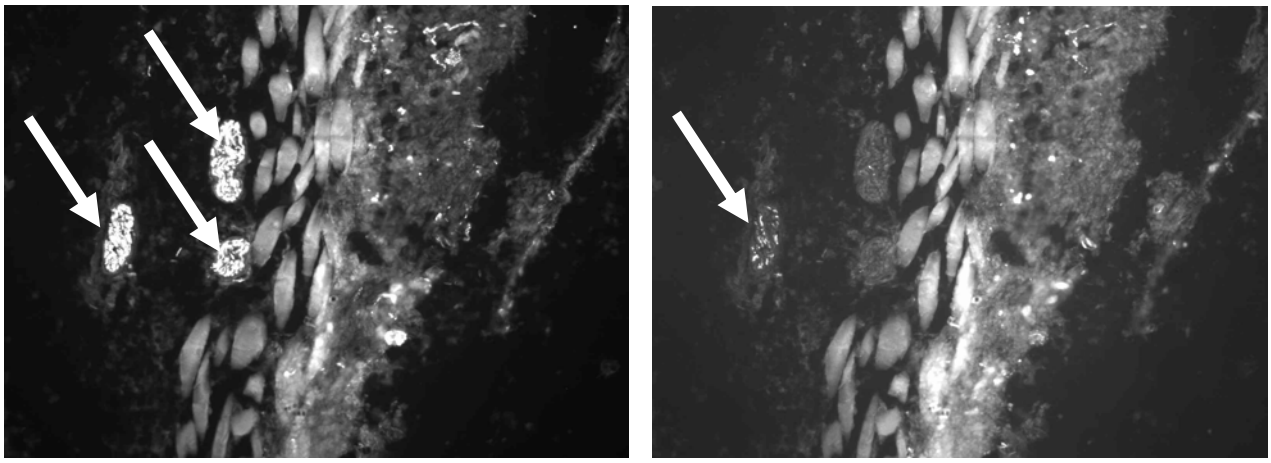

Abbildung 9: PGP-positive (links) und SP-positive (rechts) Nervenfasern
Von den drei in der linken Abbildung zu sehenden Nervenfaserbündeln (drei Pfeile), zeigt eines in der rechten Abbildung Substanz P-Immunreaktivität (einzelner Pfeil).

In der linken Hälfte der Abbildung 9 sind in der Subcutis, unterhalb der Muskelschicht, drei Nervenfaserbündel, erkennbar an ihrer PGP-Immunreaktivität (drei Pfeile), zu sehen. Im rechten Teil der Abbildung 9 sind die gleichen Nervenfaserbündel abgebildet, diesmal im Filterlicht für Substanz P. Eines der drei zuvor genannten Bündel zeigt Substanz P-Immunreaktivität (einzelner Pfeil).

Abbildung 10 zeigt wieder einen Querschnitt der Haut. Hier erfolgt der Nachweis von Substanz P-haltigen Nervenfasern in der Dermis. Diese sind einzeln verstreut im oberen Teil der linken Abbildung gleich unterhalb des Epithels zu erkennen. Einzelne Nervenfasern zeigen auch Substanz P-Immunreaktivität, was in der rechten Abbildung dargestellt ist (drei Pfeile).

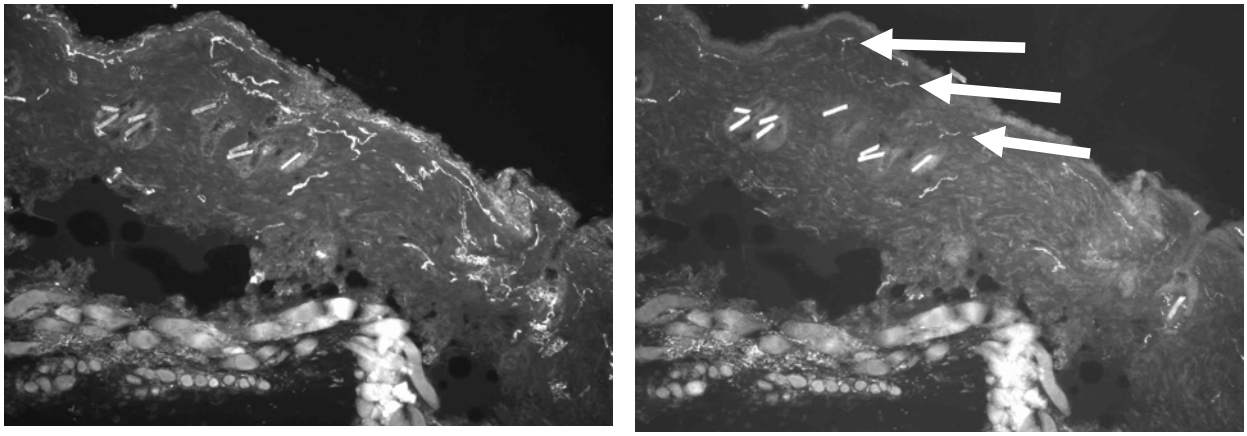

Abbildung 10: PGP-positive (links) und SP-positive (rechts) Nervenfasern
Von den in der linken Abbildung unterhalb der Epidermis verstreut liegenden Nervenfasern, zeigen in der rechten Abbildung einige Substanz P-Immunreaktivität (drei Pfeile).

3.2.2 Ganglien Th1-5 links

Die Ermittlung des Anteils der Ganglienzellen mit Substanz P-Immunreaktivität an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion erfolgte wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Der Prozentsatz an Substanz P-positiven Zellen lag sowohl in den mit Ovalbumin behandelten (Gruppe 1) als auch in den mit lediglich PBS behandelten Tieren (Gruppe 2) im Durchschnitt bei reichlich 7 % pro Ganglion (OVA: 7,4 ± 0,28 % und PBS: 7,3 ± 0,15 %). Im studentischen t-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (t-Test: $p = 0,79$). Durch Sensibilisierung und anschließender Provokation der Tiere konnte also kein Anstieg von Substanz P-haltigen Neuronen hervorgerufen werden. Auch beim Vergleich der jeweils topografisch korrespondierenden Ganglien beider Gruppen untereinander gab es keinen signifikanten Unterschied zu verzeichnen. Detaillierte Daten sind in Tabelle 5 zusammengefasst, Abbildung 11 zeigt eine grafische Darstellung der Mittelwerte über die topografisch identischen Ganglien einer Gruppe (letzte Zeile aus Tabelle 5).

In Abbildung 11 ist besonders gut zu erkennen, dass es eine gewisse Homogenität des Anteils der Substanz P-haltigen Zellen an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion zwischen Th1 - Th5 gibt. Dies gilt zusätzlich nicht nur innerhalb der einzelnen Gruppe, sondern zeigt sich für alle Tiere, egal welcher Behandlung sie unterzogen worden. So liegen die Mittelwerte der Ganglien aus Gruppe 1 zwischen 6,9 % und 8,0 %. Die der mit PBS behandelten Tiere liegen zwischen 7,0 % und 7,8 %.

Gruppe 1 OVA	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 1	5,4	10,3	5,4	7,4	7,0
Tier 2	9,0	10,5	5,0	7,8	6,8
Tier 3	4,3	6,5	7,8	7,0	6,9
Tier 4	9,3	6,2	7,2	9,6	8,1
Tier 5	6,5	7,2	8,1	8,1	8,1
Mittelwert	**6,9**	**8,1**	**6,7**	**8,0**	**7,4**

Gruppe 2 PBS	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 6	9,4	7,8	6,4	5,9	9,8
Tier 7	8,3	7,9	6,9	8,8	8,0
Tier 8	6,6	6,9	9,2	7,0	8,0
Tier 9	4,9	6,2	8,1	10,2	6,6
Tier 10	7,4	6,8	6,5	2,9	6,8
Mittelwert	**7,3**	**7,1**	**7,4**	**7,0**	**7,8**

Tabelle 5: Substanz P-positive Neurone

Anteil der Neurone mit Substanz P-Immunreaktivität an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren.

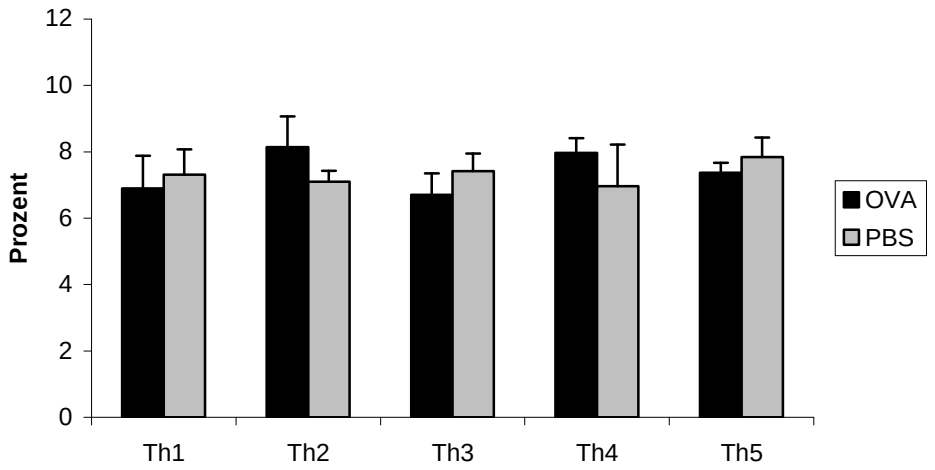

Abbildung 11: Substanz P-positive Neurone

Grafische Darstellung der Mittelwerte aus Tabelle 5 von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren, geordnet nach topografisch identischen Ganglien einer Gruppe.

3.3 Retrograde neuronale Markierung

Die Anzahl der Neurone mit Ursprung im behandelten Hautsegment konnte mit Hilfe von retrograder neuronaler Markierung durch den Farbstoff Fluorogold ermittelt werden. Der Anteil der Fluorogold-positiven Neurone an der Gesamtzahl der gezählten Neurone wurde für die sensibilisierten Tiere der Gruppe 1 und die unsensibilisierten Tiere der Gruppe 2, aufgeschlüsselt nach Tier und Ganglion, in Tabelle 6 aufgelistet. Die Mittelwerte über die topografisch identischen Ganglien (letzte Zeile der Tabelle 6) sind zur Übersicht in Abbildung 12 noch einmal grafisch abgebildet.

Gruppe 1 OVA	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 1	7,2	7,2	3,2	16,8	5,9
Tier 2	7,5	14,1	1,7	7,9	5,4
Tier 3	6,6	11,5	4,9	8,0	3,3
Tier 4	6,8	6,1	2,5	14,0	3,0
Tier 5	7,6	6,3	4,5	6,5	4,4
Mittelwert	**7,1**	**9,0**	**3,3**	**10,7**	**4,4**

Gruppe 2 PBS	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 6	7,5	20,2	6,7	3,8	9,7
Tier 7	5,4	9,1	10,3	9,8	9,8
Tier 8	3,9	11,9	16,4	11,4	14,9
Tier 9	4,5	9,0	16,1	16,2	7,3
Tier 10	8,4	12,0	9,9	5,7	15,9
Mittelwert	**6,0**	**12,4**	**11,9**	**9,4**	**11,5**

Tabelle 6: Fluorogold-positive Neurone
Anteil der retrograd markierten Neurone an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren.

Hieraus ist zu ersehen, dass in den Ganglien der unsensibilisierten Tiere im Durchschnitt mehr durch Fluorogold angefärbte Neurone zu finden waren, als in denen der mit Ovalbumin behandelten Tiere (PBS: 10,2 ± 1,19 %, OVA: 6,9 ± 1,37 %). Ein besonderes Distributionsmuster konnte jedoch nicht festgestellt werden, der Anteil der markierten Neurone variierte sowohl von Tier zu Tier als auch zwischen den topografisch identischen Ganglien. In der Kontrollgruppe (Gruppe 2) lagen die Werte zwischen 6,0 % und 12,4 %, während sie in der sensibilisierten Gruppe (Gruppe 1) zwischen 3,3 % und 10,7 % schwankten. Obwohl der Anteil der Fluorogold-positiven Neurone in den unsensibilisierten Tieren im Durchschnitt höher war als der der Ovalbumin-Gruppe, waren sowohl in Th1 (PBS: 6,0 ± 0,87 %; OVA: 7,1 ± 0,19 %) als auch in Th4 (PBS: 9,4 ± 2,19 %; OVA: 10,7 ± 2,02 %) der sensibilisierten Tiere prozentual mehr retrograd markierte Ganglienzellen zu finden.

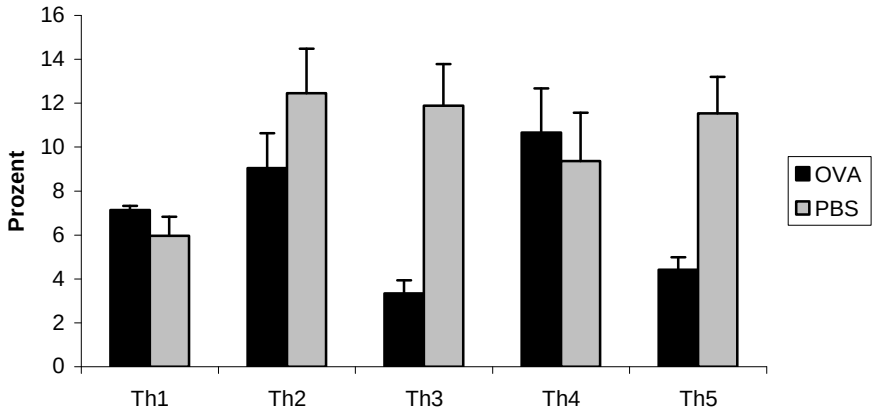

Abbildung 12: Fluorogold-positive Neurone

Grafische Darstellung der Mittelwerte aus Tabelle 6 von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren, geordnet nach topografisch identischen Ganglien einer Gruppe.

Auch innerhalb der topografisch gleichen Ganglien einer Gruppe gab es vereinzelt sehr große Schwankungen. Wie in Abbildung 13a zu sehen, trifft dies in der Ovalbumin-Gruppe vor allem für Th4 zu, in der PBS-Gruppe für Th3 und Th5 (siehe Abbildung 13b). Dieser sehr unterschiedliche Erfolg bei der Anfärbung der Neurone hat jedoch keinen Einfluss auf das Hauptergebnis dieser Arbeit.

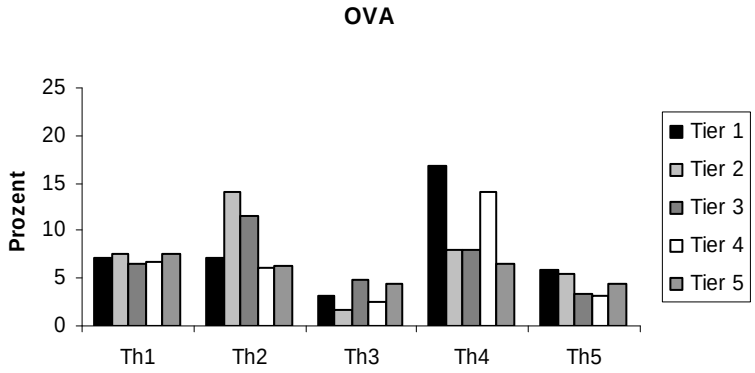

Abbildung 13a: Fluorogold-positive Neurone

Anteil der retrograd markierten Neurone an der Gesamtzahl der Neurone von sensibilisierten (OVA) Tieren, dargestellt für jedes einzelne Ganglion und geordnet nach topografisch identschen Ganglien.

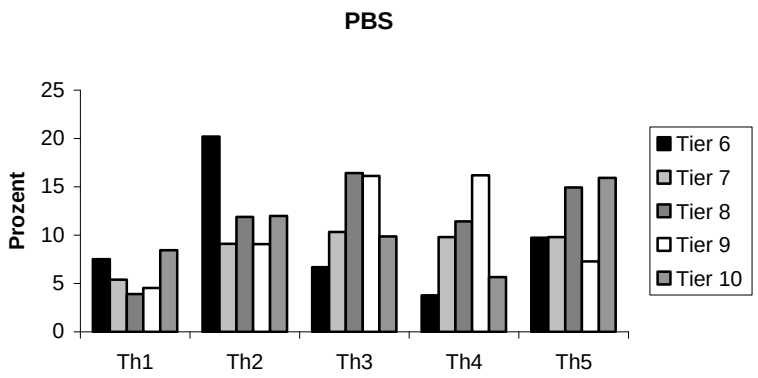

Abbildung 13b: Fluorogold-positive Neurone

Anteil der retrograd markierten Neurone an der Gesamtzahl der Neurone von unsensibilisierten (PBS) Tieren, dargestellt für jedes einzelne Ganglion und geordnet nach topografisch identischen Ganglien.

3.4 Co-Lokalisation von Substanz P und Fluorogold

Der Anteil der sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone an der Gesamtzahl der Fluorogold-positiven Ganglienzellen wurde ausgewertet, um eine Information über die Substanz P-Immunreaktivität der Neurone mit Ursprung im behandelten Hautsegment zu erhalten. Es wurden also ausschließlich die Ganglienzellen der von der Sensibilisierung und Provokation betroffenen Nervenfasern hinsichtlich ihrer Substanz P-Immunreaktivität untersucht, so dass eine noch detailliertere Aussage über die Auswirkung der Behandlung getroffen werden konnte. Die Ermittelung der Werte erfolgte wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Beim Gruppenvergleich von Ovalbumin-sensibilisierten (Gruppe 1) und PBS-behandelten (Gruppe 2) Tieren war kein signifikanter Unterschied in der Substanz P-Immunreaktivität von Fluorogold-positiven Neuronen festzustellen (t-Test: $p = 0{,}24$; OVA: 12,28 ± 1,64 %, PBS: 10,11 ± 0,42 %). Und auch beim Vergleich der topographisch identischen Ganglien von sensibilisierten und Kontrolltieren zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Es konnte in $TRPV_1$-knockout Mäusen durch Allergisierung kein Anstieg von Substanz P-haltigen Neuronen, welche das behandelte Hautsegment versorgen, hervorgerufen werden. In Tabelle 7 sind die Daten hierzu einzusehen, Abbildung 14 zeigt eine grafische Darstellung der Mittelwerte aus Tabelle 7.

Gruppe 1 OVA	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 1	6,3	23,8	13,9	6,7	13,9
Tier 2	13,8	4,3	17,4	6,7	8,3
Tier 3	7,3	14,7	14,3	11,4	12,9
Tier 4	21,2	14,3	28,0	9,1	3,7
Tier 5	13,1	13,8	13,0	7,7	7,5
Mittelwert	**12,3**	**14,2**	**17,3**	**8,3**	**9,3**

Gruppe 2 PBS	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 6	4,7	3,5	25,9	7,7	15,5
Tier 7	9,7	12,9	8,1	9,7	9,9
Tier 8	16,0	15,2	6,0	8,0	5,7
Tier 9	8,0	9,4	11,0	6,9	9,3
Tier 10	12,6	7,0	7,3	17,0	5,8
Mittelwert	**10,2**	**10,0**	**11,7**	**9,9**	**9,2**

Tabelle 7: Co-Immunreaktivität von SP und FG

Anteil der sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone an der Gesamtzahl der Fluorogold-positiven Neurone pro Ganglion von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren.

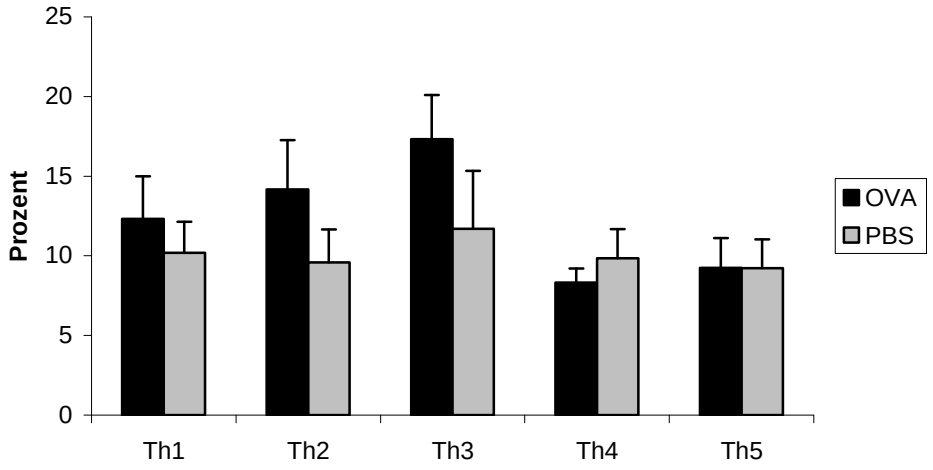

Abbildung 14: Co-Immunreaktivität von SP und FG

Grafische Darstellung der Mittelwerte aus Tabelle 7 von sensibilisierten (OVA) und unsensibilisierten (PBS) Tieren, geordnet nach topografisch identischen Ganglien.

3.5 Gruppe 3

Zur Kontrolle der Auswirkungen des Farbstoffes Fluorogold auf den Anteil der Substanz P-haltigen Neurone an der Gesamtzahl der Ganglienzellen wurden die Tiere der Gruppe 3 mit Ovalbumin sensibilisiert, jedoch nicht retrograd neuronal durch den Farbstoff markiert (Tracing). Gezählt wurden nun wieder die Substanz P-haltigen Neurone und deren Anteil an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion wurde bestimmt. Im Durchschnitt waren 8,0 ± 0,62 % der Neurone der Tiere ohne Farbstoffmarkierung Substanz P-positiv, 7,4 ± 0,28 % waren es bei den Tieren der Fluorogold-positiven Gruppe 1. Mit dem studentischen t-Test konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (p = 0,45), auch nicht zwischen den einzelnen topografisch identischen Ganglien der jeweiligen Gruppen. Dies zeigt, dass durch den Farbstoff selbst keine Änderung der Anzahl der Substanz P-positiven Neurone hervorgerufen wurde. Die Mittelwerte der einzelnen Ganglien sind in Tabelle 8 dargestellt, Abbildung 15 veranschaulicht das Ergebnis.

Gruppe 1 mit Tracing	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 1	5,4	10,3	5,4	7,4	7,0
Tier 2	9,0	10,5	5,0	7,8	6,8
Tier 3	4,3	6,5	7,8	7,0	6,9
Tier 4	9,3	6,2	7,2	9,6	8,1
Tier 5	6,5	7,2	8,1	8,1	8,1
Mittelwert	**6,9**	**8,1**	**6,7**	**8,0**	**7,4**

Gruppe 3 ohne Tracing	Th1 %	Th2 %	Th3 %	Th4 %	Th5 %
Tier 11	4,9	6,1	8,8	11,0	9,2
Tier 12	6,1	8,8	9,4	10,2	14,8
Tier 13	5,7	6,5	9,1	4,7	6,1
Tier 14	7,6	8,3	9,5	8,1	8,0
Tier 15	6,8	7,1	4,9	5,8	12,1
Mittelwert	**6,2**	**7,4**	**8,3**	**7,9**	**10,0**

Tabelle 8: Auswirkung der retrograden neuronalen Markierung (Tracing)
Anteil der Neurone mit Substanz P-Immunreaktivität an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion von sensibilisierten Tieren mit und ohne Farbstoffmarkierung (mit/ohne Tracing), dargestellt jeweils für die topografisch identischen Ganglien einer Gruppe.

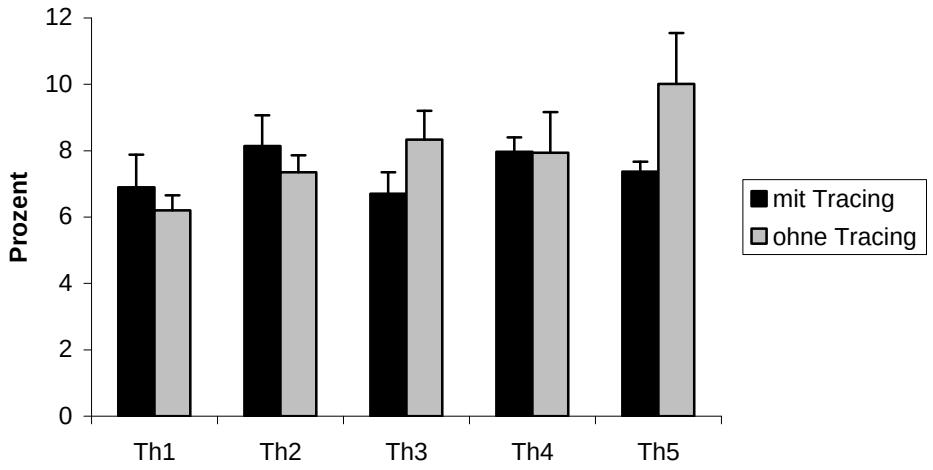

Abbildung 15: Auswirkung der retrograden neuronalen Markierung (Tracing)
Grafische Darstellung der Mittelwerte aus Tabelle 8 von Tieren mit und ohne retrograder neuronaler Markierung (mit/ohne Tracing), geordnet nach topografisch identischen Ganglien.

3.6 Entzündungsprozess der Haut

Zur Einschätzung der Entzündungsreaktion der Haut im behandelten Dermatom nach Sensibilisierung oder nach Kontrollbehandlung wurde diese sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch untersucht.

Makroskopisch zeigten sich keine entzündlichen Veränderungen wie Rötung oder Schwellung, weder bei den sensibilisierten Tieren (Gruppe 1 und 3) noch bei den Kontrolltieren (Gruppe 2). Für die mikroskopische Betrachtung der inflammatorischen Reaktion wurde für exemplarische Querschnitte der Haut aus dem entsprechenden Dermatom eine HE-Färbung zur Darstellung von Entzündungszellen durchgeführt. Bei der anschließenden Betrachtung unter dem Lichtmikroskop waren weder in der Haut der sensibilisierten noch in der Haut der unsensibilisierten Tiere Ansammlungen von Entzündungszellen zu finden (siehe Abbildung 16). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Untersuchung auf den Substanz P-Gehalt der Neurone der Spinalganglien. Dieser lag nach Sensibilisierung nicht höher als bei den Tieren ohne Behandlung, so dass auch keine verstärkte Entzündungsreaktion zu erwarten gewesen war.

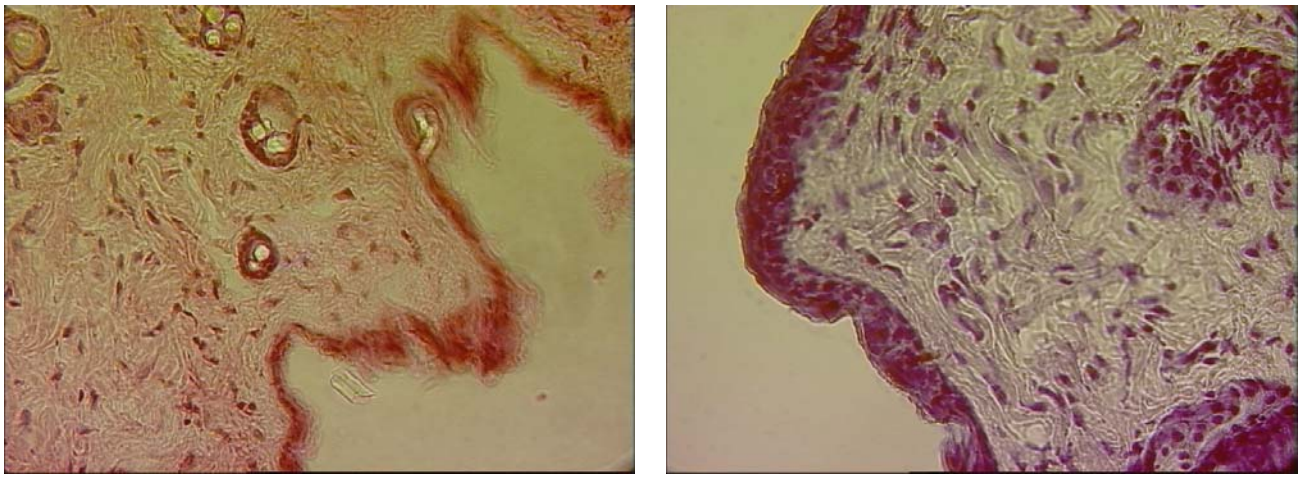

Abbildung 16: Entzündungsprozess

Normaler Hautquerschnitt ohne Anzeichen einer Entzündungsreaktion aus dem behandelten Dermatom sensibilisierter (links) und unsensibilisierter (rechts) Tiere.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in $TRPV_1$-knockout Mäusen durch Sensibilisierung mit Ovalbumin und anschließender Provokation mit selbigem durch Injektion in die Haut kein Substanz P-Anstieg in Neuronen mit Ursprung in der Haut zu verzeichnen ist. Es konnte kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der Substanz P-positiven, die Haut versorgenden Neuronen zwischen Kontrollgruppe und sensibilisierter Gruppe festgestellt werden.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Tiermodell

Zu den Kennzeichen der atopischen Dermatitis gehören Juckreiz und kutane Hyperreaktivität. Der Histaminpegel ist sowohl in betroffener als auch in nicht betroffener Haut erhöht, die Zahl der Mastzellen ist gestiegen, es wird vermehrt Histamin aus Basophilen freigesetzt, auch erhöhte Substanz P-Werte wurden nachgewiesen. Diese Daten sprechen für eine neuroimmunologische Dysregulation als Ursache der atopischen Dermatitis [135,136].

Eine Möglichkeit um diese komplexe und multidimensionale Dysregulation zwischen Immunsystem, endokrinem System und Nervensystem besser verstehen zu können, ist die Entwicklung von passenden Tiermodellen. Diese haben den Vorteil, dass störende oder beeinflussende Umweltfaktoren sehr gut reguliert werden können. Auch die hohe Verfügbarkeit von Gewebe lässt die Forschung schneller voranschreiten. Mäuse repräsentieren durch bestimmte Eigenschaften dabei die bevorzugte Spezies. Zu den Vorteilen zählen der schnelle Generationenwechsel, die Möglichkeit der Erstellung von Genom-Dateien und die relativ einfache Züchtung von knockout-Mäusen. Trotzdem sind auch den Tiermodellen Grenzen gesetzt, welche nicht unbeachtet bleiben dürfen. So gibt es mehr oder weniger große anatomische und physiologische Unterschiede zwischen der Haut und ihrer Innervation von Mensch und Maus. Zum Beispiel konnten die Tachykininrezeptoren NK1-3 in (der Haut) der Maus zwar eindeutig identifiziert werden, für den Menschen gibt es jedoch abweichende Ergebnisse. In einigen Studien konnte nur der NK1-Rezeptor im Menschen nachgewiesen werden [58,99,137]. Auch in der Expression der NK-Rezeptoren gibt es Unterschiede. Während Keratinozyten der Maus vorwiegend den NK2-Rezeptor exprimieren [138], ist an menschlichen Keratinozyten vor allem der NK1-Rezeptor zu finden [139].

In dieser Arbeit wurden Mäuse vom Stamm C57 BL/6 verwendet. Bei Versuchen mit Sensibilisierung durch verschiedene Allergene (Ovalbumin, Hausstaub, Graspollen, Katzenhaar) entwickelte sich in früheren Studien mit diesen Tieren fast jedesmal eine Hyperreaktivität vom Sofort-typ. Der Stamm gehört also zu den intermediate-respondern [140]. Ein weiterer sehr gut geeigneter Stamm für die Erforschung von vor allem der neurogenen Komponente in der atopischen Dermatitis ist der der NC/Nga-Mäuse. Diese zu den high-respondern gehörenden Tiere entwickeln zum einen unter nicht pathogenfreien Bedingungen bereits spontan atopische Dermatitis-ähnliche Symptome und haben zusätzlich einen höheren Basiswert an Substanz P als C57 BL/6-Mäuse. Da für die NC/Nga-Mäuse jedoch keine $TRPV_1$-knockout Tiere entwickelt wurden, blieb der C57 BL/6-Stamm die optimale Wahl für diese Arbeit.

4.2.2 Knockout Mausmodell

Durch die Möglichkeit Tiere zu züchten, denen ein ganz bestimmtes Gen fehlt, können in der Forschung nun die Auswirkungen und Aufgaben speziell eines Proteins, Rezeptors etc. untersucht werden. Zur Züchtung von Mäusen mit vermindertem Gensatz wird in embryonale Stammzellen eine nicht funktionale Kopie des entsprechenden Gens eingeschleust. Diese manipulierten Stammzellen werden nun in Blastozysten injiziert und in den Uterus des Muttertieres eingesetzt. Einige der so entstandenen Hybriden tragen das „neue“ Gen auch in ihren Keimzellen und können es an die nächste Generation weitergeben. Durch Kreuzung zweier entstandener heterozygoter Mäuse können nun homozygote Tiere gezüchtet werden, denen genau ein bestimmtes Gen fehlt [141,142]. Das Hauptproblem dieses Modells ist die mögliche Beeinflussung der prä- und postnatalen Entwicklung durch den Gendefekt. Dies kann zu Veränderungen führen, die von Bedeutung für die spätere Krankheitsentwicklung sind. Weiterhin kann es genetisch angelegte Schutzmechanismen gegen Genverlust geben, die zum Beispiel durch eine Vergabe der jeweiligen Aufgabe an mehrere Genorte zur Funktionsübernahme durch andere Proteine oder Rezeptoren etc. führen. Und auch der Mechanismus der Hochregulierung von Komponenten in kompensatorischen Prozessen kann zur Hinfälligkeit der entwickelten Mauspopulation führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der $TRPV_1$ einen Teil der Verantwortung für die Substanz P-Synthese trägt, da bei Mäusen ohne diesen Rezeptor die vermehrte Substanz P-Produktion nach Sensibilisierung mit Ovalbumin ausblieb. Angesichts der möglichen Nachteile des knockout Modells wäre eine weitere Hypothese jedoch, dass der Rezeptor nicht wie angenommen in die Regulation der Synthesemenge für Substanz P eingreift, sondern in der Entwick-

lung maßgeblich an der Bildung von Substanz P-produzierenden Neuronen beteiligt ist, so dass die Tiere ohne diesen Rezeptor gar keine oder nur wenige entsprechende Neurone besitzen. Von Caterina et al. [143] konnte dies jedoch widerlegt werden. In deren Arbeit wird postuliert, dass der $TRPV_1$ von hauptsächlich zwei Gruppen von Neuronen mit geringem Durchmesser gebildet wird: die einen produzieren proinflammatorische Neuropeptide wie Substanz P, die anderen können über ihre Affinität zu dem Lectin IB4 [144] definiert werden. In den von dieser Forschergruppe entwickelten $TRPV_1$-knockout Mäusen konnten keine Veränderungen im Anteil von Substanz P-produzierenden oder Lectin IB4-positiven Neuronen an der Gesamtzahl der Neurone im Spinalganglion festgestellt werden, so dass eine fehlende oder verminderte Ausbildung entsprechender Neurone durch den Mangel an $TRPV_1$ nicht anzunehmen ist. Dennoch wäre zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit eine Versuchreihe mit dem $TRPV_1$-Antagonisten Capsazepin, welcher bei gleichem Versuchsaufbau Mäusen, die den Rezeptor besitzen, verabreicht wird, von Bedeutung, um die fehlende Überproduktion von Substanz P wirklich dem Capsaicinrezeptor zuordnen zu können und nicht einer Veränderung im Genom der Tiere.

4.2.3 Retrograde neuronale Markierung - Tracing

Mit der Methode der retrograden neuronalen Markierung können Ganglienzellen eines bestimmten Ursprungs identifiziert werden. Zur Identifizierung der Ganglien mit Ursprung in der Haut wurde im entsprechenden Dermatom der fluoreszierende Farbstoff Fluorogold injiziert. Dieser gelangte entlang der Nervenbahnen bis zu den Spinalganglien und färbte den zum Nerv gehörenden Zellkörper an. In dieser Arbeit wurden je nach Ganglion zwischen 3,3 % und 12,5 % der Neurone mit dem Farbstoff angefärbt. Diese starken Schwankungen waren auch zwischen topographisch identischen Ganglien der einzelnen Tiere innerhalb einer Gruppe auszumachen, weswegen sie wahrscheinlich methodisch bedingt sind. So scheinen schon kleine Variationen der Injektionsstelle zu großen Verschiebungen in der Anzahl der angefärbten Neurone zu führen. Da in dieser Arbeit jedoch die sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Neurone als Anteil an den Fluorogold-positiven Neuronen und nicht an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion dargestellt wurden, hat das unterschiedliche Ergebnis des Tracings keinen Einfluß auf das Gesamtergebnis.

Ein möglicher Nachteil des Tracings ist ein beschriebener Zelluntergang durch den injizierten Farbstoff, der aber abhängig von Substanz und Konzentration zu betrachten ist [145]. Für diese Arbeit kann darüber keine genaue Aussage getroffen werden. Der Anteil der Substanz P-

positiven Neurone an der Gesamtzahl der Neurone pro Ganglion weicht jedoch in der Gruppe ohne retrograde neuronale Markierung (Gruppe 3) nicht von dem der getracten Gruppen ab. Weiterhin wurde der Farbstoff nicht direkt in die Nervenzellen, sondern in das umgebende Gewebe der Nervenfaserendigungen injiziert, so dass höchstens von einer geringen Schädigung ausgegangen wird.

4.3 Substanz P-Regulierung

Substanz P ist ein Neurotransmitter, der im zentralen und peripheren Nervensystem weit verbreitet ist, so auch in der Haut. Er ist in der Lage eine Anzahl von inflammatorischen Prozessen wie Vasodilatation, Plasmaextravasation, Leukozytenaktivierung, Zytokinproduktion und Mastzellaktivierung auszulösen. Daher wird auch eine Beteiligung von Substanz P bei vielen allergischen Hauterkrankungen wie zum Beispiel atopischer Dermatitis und Psoriasis vermutet. Hinweise dafür gibt es viele. Eine Untersuchung an Patienten mit atopischer Dermatitis zeigte einen deutlichen Anstieg von Substanz P-positiven Nervenfasern in der Haut gegenüber gesunden Probanden [134]. Tierstudien zeigen ähnliche Ergebnisse. In NC/Nga-Mäusen, welche unter konventionellen Bedingungen gehalten atopische Dermatitis ähnliche Hautveränderungen entwickeln, wurden vermehrt Substanz P-enthaltende Mastzellen, ein erhöhter Substanz P-Serumspiegel und eine größere Anzahl an Substanz P-haltigen Nervenfasern gefunden [146]. Und auch in der Haut von Mäusen mit experimentell durch Sensibilisierung induzierter atopischer Dermatitis lag die Zahl an Substanz P-haltigen Mastzellen und Nervenfasern höher als in unbehandelten Tieren [147]. In Studien mit knockout-Mäusen konnte ebenfalls eine entscheidende Rolle von Substanz P an kutanen Entzündungen nachgewiesen werden. Fehlte den Tieren das Gen für die neutrale Endopeptidase, welche für den Abbau von Substanz P zuständig ist, konnte eine verstärkte Entzündungsreaktion gemessen werden. Fehlte hingegen das Gen für den NK_1-Rezeptor, welcher vorrangig die proinflammatorischen Prozesse von Substanz P vermittelt, war die Inflammation stark vermindert [148].

4.3.1 Nerve Growth Factor (NGF)

Für die Regulationsmechanismen der Substanz P-Produktion und –Freisetzung im Zuge physiologischer und pathologischer Prozesse gibt es mehrere Ansatzpunkte und es ist offensichtlich, dass viele verschiedene Regulationswege einzeln oder im Zusammenspiel zu einer verstärkten

oder abgeschwächten Substanz P-Wirkung führen. Ein gut belegter und erforschter Mechanismus ist der der verstärkten Substanz P-Synthese durch NGF. NGF, welcher essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Neuronen, aber auch ein wichtiger Entzündungsmediator ist [149], gehört zur Familie der Neurotrophine. Synthetisiert wird er vor allem von Entzündungszellen, aber auch von Fibroplasten, Alveolarepithelzellen, Muskelzellen etc. [150]. Dieser Wachstumsfaktor, für den erhöhte Werte im Serum sowie auch im betroffenen Gewebe bei allergischen Erkrankungen gefunden werden [151,152], vermittelt zum einen eine direkte Verstärkung von inflammatorischen Prozessen durch zum Beispiel Stimulation der Mastzelldegranulation und Förderung der Histaminfreisetzung. Zum anderen wird indirekt durch Aktivierung des trkA-Rezeptors auch die Substanz P-Biosynthese und –Ausschüttung von afferenten Neuronen gesteigert und so die Entzündungsreaktion beeinflußt [153]. Dieser Regulationsmechanismus konnte bereits in zahlreichen Experimenten nachgewiesen werden, bei denen ein signifikanter Anstieg von Substanz P-positiven Neuronen mit Ursprung in der Haut nach Injektion von NGF verzeichnet werden konnte [154,155]. Dabei erfolgte nicht nur eine Steigerung der Substanz P-Synthese in bereits Substanz P-produzierenden Neuronen, NGF induziert die Substanz P-Produktion auch in bisher nicht Substanz P-exprimierenden Neuronen [156].

4.3.2 Proteinase-activated Rezeptor 2 (PAR2)

Auch der Proteinase-activated Rezeptor 2 (PAR 2) wird als Liberator von proinflammatorischen Neuropeptiden, so auch Substanz P, beschrieben [157]. Er gehört zur Gruppe der Proteinase-activated Rezeptoren, zu der bisher vier verschiedene Rezeptoren gezählt werden. In Experimenten mit Agonisten des PAR 2 wurden die gleichen proinflammatorischen Effekte wie sie auch für Neuropeptide beschrieben werden, festgestellt. Zusätzlich befinden sich Mastzellen mit der für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlichen Tryptase in enger räumlicher Beziehung zu afferenten, Substanz P und CGRP enthaltenden Nervenfasern [158,159]. Exprimiert wird PAR 2 unter anderem von Neuronen des Spinal- und Trigeminalganglions, welche häufig auch Substanz P und CGRP enthalten [157,160].

4.3.3 Glukokortikoide

Eine Hemmung und damit auch Regulation von Substanz P bewirken die Derivate der Glukokortikoide. So konnte die Substanz P-vermittelte Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch Behand-

lung mit Dexamethason verhindert werden [161], die Ausbildung des bei Entzündungsreaktionen auftretenden und durch Substanz P vermittelten Ödemes konnte durch lokale Behandlung mit Glukokortikoiden deutlich reduziert werden [162], und auch die Hautrötung nach Reizung wurde mit Prednison vermindert [163]. Dies geschieht zum einen auf der Ebene der Genregulation des NK1-Rezeptors, welcher die Effekte von Substanz P vermittelt [164,165]. Aber auch die Substanz P-Synthese in den Spinalganglien direkt wird inhibiert [166]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Anstieg an Substanz P-positiven Neuronen nach Sensibilisierung durch Behandlung mit Glukokortikoid-Derivaten wieder rückgängig gemacht werden konnte [167]. Dies macht deutlich, warum Steroide schon lange erfolgreich in der lokalen Behandlung von entzündlichen Hauterkrankungen angewandt werden konnten

4.3.4 Neutrale Endopeptidase und Angiotensin converting Enzym

Ein weiterer essentieller Faktor der Regulation von Substanz P ist ihre Deaktivierung. Bewerkstelligt wird dies für alle Tachykinine durch hauptsächlich zwei Enzyme: Neutrale Endopeptidase (NEP) und Angiotensin converting Enzym (ACE) [60]. Diese beiden Enzyme kontrollieren die Bioverfügbarkeit der von sensorischen Nerven, Immun- und Hautzellen freigesetzten Mediatoren nach endogenen oder exogenen schädlichen Stimuli [168]. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der NEP-Aktivität beziehungsweise bei nicht Vorhandensein der NEP eine deutliche Steigerung der Entzündungsreaktion erreicht wird [148]. In Bezug auf das ACE konnte belegt werden, dass bei genetisch veränderten Mäusen mit einer nur heterozygoten Anlage für ACE die Entzündungsreaktion bei atopischer Dermatitis stärker verlief als bei entsprechend homozygoten Mäusen. Im Gegensatz dazu gab es jedoch keine Unterschiede der inflammatorischen Reaktion von ACE +/- - und ACE -/- -Tieren auf Hautirritanzien [169]. NEP ist vor allem in den Metabolismus von Tachykininen im Gehirn [170], Rückenmark [65] und peripheren Geweben [60] integriert, während ACE für den Tachykininabbau im Plasma und im Liquor cerebrospinalis [66] verantwortlich ist.

4.3.5 Transient Receptor Potential Vanilloid 1 ($TRPV_1$)

Für den Rezeptor $TRPV_1$, welcher 1997 durch Expressionsklonierung identifiziert werden konnte, wurde ebenfalls eine Rolle bei der Substanz P-Freisetzung nachgewiesen. Er gehört zur Unterfamilie der TRPV, bestehend aus 6 Rezeptoren ($TRPV_{1-6}$) [123] und ist ein nicht-selektiver

Kationenkanal der ausschließlich Vannilloide bindet. Ursprünglich wurde er beschrieben als Rezeptor für das in der Natur vorkommende, lipophile Alkaloid Capsaicin [122]. Aktiviert wird der Rezeptor jedoch durch viele verschiedene Stimuli. Dazu gehören nicht nur Vanilloide wie Capsaicin und Resiniferatoxin, sondern auch ein niedriger pH (pH 5-6) [171,172], hohe Temperaturen zwischen 42 und 53° C [122], das Endocannabinoid Anandamid [173], Produkte der Lipoxygenase wie Leukotrien B_4 [174], N-Arachidonoyl-Dopamin [175], Ethanol [128] etc., Überblick bei [127].

Nachgewiesen werden konnte $TRPV_1$ vor allem in einer Gruppe von sensiblen, afferenten A-delta- und C-Faser-Nerven, stammend aus den Trigeminal-, Vagal- und Spinalganglien. Diese Gruppe von Neuronen wird wegen ihrer Fähigkeit noxische Reize chemischer, thermischer und mechanischer Art zu erfassen und zu vermitteln, als polymodale Nozizeptoren bezeichnet. Auch im zentralen Nervensystem ist der $TRPV_1$ weit verbreitet. So konnte eine mRNA-Expression im limbischen System, im Striatum, im Hypothalamus, in thalamischen Kernen, in der Substantia nigra, im Locus coerulus, in der Formatio reticularis, im Zerebellum und im Rückenmark bestätigt werden [176]. In nicht-neuronalen Zellen wurde $TRPV_1$-mRNA bisher in Epithelzellen des Urothels [177], in Keratinozyten [178], in der Epidermis [179], in der Niere [180] und am Gaumen [181] gefunden (Überblick bei [127,182]). Erst kürzlich konnte in einer Arbeit mit Hilfe von Immunhistochemie auch in dermalen sensorischen Nervenfasern, Mastzellen, epidermalen Keratinozyten, dermalen Blutgefäßen, an der inneren Wurzelscheide und dem Infundibulum von Haarfollikeln, in Sebozyten und Schweißdrüsen der $TRPV_1$ gefunden und so eine weite Verbreitung in der Haut nachgewiesen werden [182] (siehe Tabelle 9).

	Immunreaktivität		
	Stark	**Schwach**	**Keine**
Epidermis	Stratum granulosum, basale und suprabasale Keratinozyten, epidermaler Ausführungsgang von Schweißdrüsen	-	Langerhanszellen, Melanozyten
Dermis	Innere Wurzelscheide und Infundibulum der Haarfollikeln, verschiedene Sebozyten, Schweißdrüsengang, Blutgefäße, Mastzellen	Sekretorischer Teil ekkriner Schweißdrüsen	Bulbus und äußere Wurzelscheide der Haarfollikel, Musculi arrectores pili, Sebozyten, Kollagen- und elastische Fasern, Fibroblasten
Nervenfasern	Sensorische Axone von myelinisierten und unmyelinisierten dermalen Nerven	Intraepidermale Nervenfasern, Schwannsche Zellen, Perineurium	Autonome Nervenfasern von Hautdrüsen, Haarfollikel, Blutgefäße, Musculi arrectores pili

Tabelle 9: Immunreaktivität des $TRPV_1$ in gesunder menschlicher Haut [182]

Exprimiert wird der $TRPV_1$ in mindestens 3 Zellkomponenten: in der zytoplasmatischen Membran, im endoplasmatischen Retikulum und in zytoplasmatischen Vesikeln [133]. Während der $TRPV_1$ in der Zellmembran die eigentliche Rezeptorfunktion ausübt, wie zum Beispiel Transmitterfreisetzung, dienen die $TRPV_1$ in den Vesikeln als Reserve, die schnell in die Plasmamembran transloziert werden können [183]. Die Rolle der im endoplasmatischen Retikulum exprimierten $TRPV_1$ ist noch unklar. Eventuell sind sie in die Regulation der Ca^{2+}-Homöostase involviert [184-186].

Die Aktivierung des $TRPV_1$ initiiert eine Reihe von Vorgängen, die man grob in die drei im Folgenden genannten Bereiche unterteilen kann. 1) Erregung, 2) Desensibilisierung, 3) Zelltoxizität [116]. Das Binden eines Agonisten bedingt die Öffnung der $TRPV_1$-Pore wodurch ein Kationeneinwärtsstrom, überwiegend aus Calciumionen bestehend, resultiert und die Membran depolarisiert [127]. Es wird ein Aktionspotential generiert, welches orthodrom zum Gehirn weitergeleitet wird und so zur Schmerzwahrnehmung führt oder reflektorische Antworten wie Husten, Kontraktionen der Blasenwand, Darmperistaltik und anderes hervorruft. Die Erregung peripherer sensorischer Nervenendigungen durch Vanilloide führt des Weiteren zur Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide wie Substanz P und CGRP [13]. Auf die Phase der Erregung nach Vanilloidapplikation folgt eine Art refraktärer Zustand, in dem Neurone weder auf weitergehende Vanilloidgabe noch auf andere Reize, wie noxische Hitze, ansprechen, was wie bereits zuvor beschrieben, dazu führte, das Capsaicin als Analgetikum seit geraumer Zeit Gebrauch findet.

Die Beteiligung von $TRPV_1$ an der Substanz P-Freisetzung konnte wiederholt nachgewiesen werden. So zeigt sich z.B. nach der Behandlung der Haut mit Capsaicin, dessen Wirkungen durch $TRPV_1$ vermittelt werden, eine inflammatorische Reaktione wie Rötung, Schwellung mit Schmerzsensationen. Diese beruht auf der selektiven Erregung einer Untergruppe somatoviszeraler Afferenzen mit unmyelinisierten und in geringerem Maße dünnmyelinisierten Axonen. Dabei kommt es zur Entleerung von Neuropeptiden, unter anderem Substanz P und CGRP, aus ihren Speichervesikeln [187], welche die eben beschriebene neurogene Entzündung auslösen. In verschiedenen Arbeiten wird zusätzlich die Hypothese aufgestellt, dass der $TRPV_1$ nicht nur für die Ausschüttung von Substanz P, sondern auch deren Biosynthese verantwortlich ist. Diese Annahme beruht auf dem Wissen über die starke Co-Lokalisation von $TRPV_1$ und Substanz P. Dies wurde unter anderem gezeigt für das Epithel der Trachea von Meerschweinchen [188] und für Nervenfasern der menschlichen Haut [182]. Auch bei Versuchen mit Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass für alle Substanz P-positiven Neurone der Spinalganglien, welche speziell die Atemwege oder die Nasenschleimhaut versorgten, eine komplette Co-Immunreaktivität mit

$TRPV_1$ vorlag [131]. Wirklich untersucht wurde der Einfluß von $TRPV_1$ auf die Entwicklung der Substanz P-Immunreaktivität von (Haut-)Neuronen nach Sensibilisierung, also seine Bedeutung für die Substanz P-Biosynthese jedoch bisher noch nicht.

Deshalb sollte in dieser Arbeit mit Hilfe von $TRPV_1$-knockout Mäusen eine Aussage über die Mitwirkung des Rezeptors an der vermehrten Synthese von Substanz P in den die Haut versorgenden Neuronen nach Allergisierung getroffen werden. In einer noch nicht publizierten gruppeninternen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass es bei mit Ovalbumin sensibilisierten Mäusen, welche den Rezeptor $TRPV_1$ exprimieren, nach Allergeninjektion in die Haut zu einem Anstieg von Substanz P-positiven Neuronen in den zum Provokationsort assoziierten Spinalganglien kommt. Es zeigte sich eine Steigerung der Biosynthese von Substanz P in sensibilisierten gegenüber nicht sensibilisierten Tieren. Die in der vorliegenden Arbeit vom gleichen Stamm stammenden, unter gleichen Bedingungen gehaltenen und nach dem gleichen Prinzip sensibilisierten und provozierten $TRPV_1$-knockout Mäuse zeigten jedoch keine Veränderung in der Substanz P-Biosynthese. Dies lässt eine Auslösung der normalerweise nach Sensibilisierung stattfindenden Synthesesteigerung von Substanz P durch $TRPV_1$ vermuten.

Auf welche Art und Weise $TRPV_1$ zur Steigerung der Substanz P-Biosynthese führt ist bisher noch nicht geklärt. Zum einen besteht die Möglichkeit eines von allen anderen Regulationsmechanismen unabhängigen Weges. So könnte die Aktivierung des Rezeptors direkt zur Auslösung von Signalkaskaden in der Zelle führen, welche die Mehrproduktion von Substanz P zur Folge haben. Dies erklärt jedoch nicht den fehlenden Anstieg von Substanz P-haltigen Neuronen nach Sensibilisierung in $TRPV_1$-knockout Mäusen, da die verstärkte Produktion von Substanz P, durch verschiedene Arbeiten belegt, auch durch NGF vermittelt wird.

So wäre zum anderen die Option des Eingriffes in die Regulation von Substanz P durch Verstärkung oder Inhibition beziehungsweise generell Auslösung eines der oben vorgestellten Mechanismen denkbar. Ein nahe liegender Ansatz ist hier, wie gerade angedeutet, die Vermittlung der NGF induzierten Up-Regulation von Substanz P durch $TRPV_1$. In atemwegsspezifischen Neuronen aus Spinalganglien von Mäusen wurde eine deutliche Co-Lokalisation von Substanz P, $TRPV_1$ und dem NGF-Rezeptor trkA gefunden [189], was auf ein Zusammenspiel dieser hinweisen kann. Eine weitere Verknüpfung von NGF und $TRPV_1$ zeigt sich in der Entdeckung, dass NGF über Aktivierung von trkA zur Phosphorylierung von $TRPV_1$ führt und dadurch einen Anstieg der $TRPV_1$–Expression durch vermehrten Einbau in die Zellmembran von Neuronen bewirkt [190,191]. Noch deutlicher zeigt sich die Verbindung zwischen $TRPV_1$ und NGF durch den Nachweis, dass die Bradykinin- oder NGF-vermittelte Potenzierung der Wärmeempfindlichkeit

die Expression von $TRPV_1$ erfordert [192]. Gegen diese Hypothese spricht, dass bei Versuchen an den die Atemwege versorgenden vagal-sensiblen Ganglien von Mäusen, ein durch NGF-Injektion induzierter Anstieg an Subtanz P-haltigen Neuronen lediglich in capsaicin-insensitiven ($TRPV_1$-negativen) Neuronen nachgewiesen werden konnte [153]. Man könnte jedoch annehmen, dass NGF über zwei verschiedene Mechanismen zur Steigerung der Substanz P-Biosynthese führt: 1. Durch eine direkte Aktivierung des trkA-Rezeptors in capsaicin-insensitiven Neuronen [151,152] 2. In $TRPV_1$–exprimierenden Neuronen durch ein Zusammenspiel von NGF und $TRPV_1$, so dass bei einer fehlenden Exprimierung von $TRPV_1$ kein Substanz P-Anstieg zu verzeichnen wäre. Welcher der beiden genannten möglichen Regulationswege wo zu finden ist, könnte von der Art des Gewebes abhängen. So zeigte sich in einer Arbeit, welche die Expression von $TRPV_1$ in Spinalganglien untersuchte, ein deutlicher Unterschied an $TRPV_1$–haltigen Neuronen zwischen viszeralen Gewebe (Harnblase) versorgenden Spinalganglien und Spinalganglien deren Nervenendigungen in der Haut liegen. Dies führte zu der Annahme, dass $TRPV_1$ in unterschiedlichen Geweben auf verschiedene Art und Weise aktiviert wird und auch je nach Innervationsort vielfältige Aufgaben übernimmt. So tragen $TRPV_1$–positive Neuronen in der Haut die Funktion eines Nozizeptors, während sie in viszeralen Organen eher als Mechanorezeptoren fungieren [193]. Es könnte also durchaus der NGF-vermittelte Substanz P-Anstieg durch das Fehlen von $TRPV_1$ in den in dieser Arbeit verwendeten Mäusen verhindert worden sein, während bei Experimenten mit Lungengewebe ein NGF-vermittelter Substanz P-Anstieg in capsaicin-sensitiven Neuronen gar nicht nachgewiesen werden konnte [153]. Um dieser Aussage Standfestigkeit zu verleihen, müssen jedoch weitere Untersuchungen angestrebt werden, insbesondere muss eine Steigerung der Substanz P-haltigen Neuronen, welche die Haut versorgen, durch NGF nachgewiesen werden.

Ein dritter Weg der Substanz P-Synthesesteigerung neben der unabhängig von anderen Mechanismen durch $TRPV_1$ vermittelten und der durch ein Zusammenwirken von $TRPV_1$ und NGF ausgelösten, wäre die Substanz P-Autoregulation, also die vermehrte Substanz P-Produktion ausgelöst über eine positive Rückkopplung durch Substanz P selbst [51]. So könnte eine durch $TRPV_1$ hervorgerufene Substanz P-Freisetzung erst zur Aktivierung von NGF führen und dadurch eine verstärkte Substanz P-Produktion initiieren. Aber auch diese Annahme ist bisher wenig untermauert und bedarf weiterer Abklärung. Sicher ist jedoch, dass die Substanz P-Biosynthese generell, als auch die $TRPV_1$-vermittelte, durch das Zusammenspiel vieler Faktoren und Substanzen reguliert wird und das Geschehen immer in Abhängigkeit von Spezies, Gewebe, exogenen und endogenen Einflüssen gesehen und interpretiert werden muss.

Zusammenfassung

Die neurogene Entzündung ist Bestandteil vieler inflammatorischer und allergischer Erkrankungen, so auch derer, welche die Haut betreffen. Sie wird ausgelöst durch Aktivierung sensibler Nerven und damit verbundener Ausschüttung von Neuropeptiden in verschiedene Gewebe. Substanz P, der wohl am besten untersuchte Vertreter der Neuropeptide, gehört zu ihren Hauptmediatoren. Über die Regulationsmechanismen der Substanz P-Produktion und –Freisetzung im Zuge physiologischer und pathologischer Prozesse gibt es verschiedene Hypothesen. Unter anderem wird über die Beeinflussung der Substanz P-Biosynthese durch den $TRPV_1$, ursprünglich als Rezeptor für das in der Natur vorkommende, lipophile Alkaloid Capsaicin beschrieben, diskutiert. Diese Annahme beruht zum einen auf dem Wissen über die durch Capsaicin hervorgerufene neurogene Entzündungsreaktion, zum anderen auf der Entdeckung der starken Co-Lokalisation von $TRPV_1$ und Substanz P.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb den Einfluss des $TRPV_1$ auf die Expression von Substanz P mit Hilfe von $TRPV_1$–knockout Mäusen zu untersuchen. Hierfür wurde das Modell der atopischen Dermatitis verwendet. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu n = 5 eingeteilt, wobei ein Teil der Tiere (n = 10) durch intraperitoneale Injektion von Ovalbumin sensibilisiert und später durch subkutane Injektion provoziert wurde. Der andere Teil (n = 5) erhielt zur Kontrolle intraperitoneal das gleiche Substanzengemisch basierend auf dem Trägerstoff PBS, nur ohne Ovalbumin. Die Provokation erfolgte auch hier mit Ovalbumin. Untersucht wurden dann die Neurone der zum Dermatom gehörenden Spinalganglien Th1-Th5. Mit Hilfe von Immunhistochemie wurde an jeweils 15 – 25 Schnitten pro Ganglion die Gesamtzahl der Neurone (durchschnittlich zwischen 100 und 200 pro Schnitt) und der Anteil der Substanz P-positiven Ganglienzellen daran ausgezählt. Weiter wurde der Anteil der aus dem Dermatom kommenden Substanz P-positiven Neurone an der Gesamtzahl der Neurone, welche das entsprechende Hautgebiet versorgen, ermittelt. Dies war möglich durch vorherige retrograde neuronale Markierung mittels des fluoreszierenden Farbstoffes Fluorogold, welcher die das Dermatom versorgenden Neurone anfärbte. Einem Teil der sensibilisierten Tiere (n = 5) wurde kein Farbstoff verabreicht, um eine beeinflussende Wirkung durch diesen auf das Ergebnis erkennen zu können. Hier zeigte sich kein Unterschied des Anteils Substanz P-haltiger Neurone an der Gesamtzahl der Ganglienzellen zwischen markierten und nicht markierten Tieren.

Der Anteil der sowohl Substanz P- als auch Fluorogold-positiven Ganglienzellen an der Gesamtzahl der die Haut versorgenden Neurone war sowohl bei den sensibilisierten als auch bei den

Kontrolltieren gleich, es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (OVA: 12,28 ± 1,64 %; PBS: 10.11 ± 0,42 %; t-Test: $p = 0,24$). Die Behandlung der $TRPV_1$-knockout Mäuse mit Ovalbumin führte demnach zu keiner Veränderung in der Substanz P-Biosynthese. Dies lässt eine Auslösung der normalerweise nach Sensibilisierung stattfindenden Synthesesteigerung von Substanz P durch den $TRPV_1$ vermuten. Auf welche Art und Weise $TRPV_1$ zur vermehrten Substanz P-Produktion führen kann, ist bisher noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Da es jedoch noch weitere die Substanz P-Freisetzung regulierende Substanzen gibt, ist offensichtlich, dass viele verschiedene Regulationswege, einer davon führt über $TRPV_1$, einzeln oder im Zusammenspiel zu einer verstärkten oder abgeschwächten Substanz P-Wirkung führen.

Literaturverzeichnis

1. Herbert MK, Holzer P: [Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2002;37:314-325.

2. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E: Funktionelle Histologie. Stuttgart, Schattauer, 2000.

3. Bos JD: The skin as an organ of immunity. Clin Exp Immunol 1997;107 Suppl 1:3-5.

4. Slominski A, Wortsman J: Neuroendocrinology of the skin. In Endocr Rev. 2000:457-487.

5. Rossi R, Johansson O: Cutaneous innervation and the role of neuronal peptides in cutaneous inflammation: a minireview. Eur J Dermatol 1998;8:299-306.

6. Eedy DJ: Neuropeptides in skin. Br J Dermatol 1993;128:597-605.

7. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD: Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. Nature 1993;363:159-163.

8. Pincelli C, Fantini F, Giannetti A: Neuropeptides and skin inflammation. Dermatology 1993;187:153-158.

9. Ansel JC, Kaynard AH, Armstrong CA, Olerud J, Bunnett N, Payan D: Skin-nervous system interactions. J Invest Dermatol 1996;106:198-204.

10. Bayliss WM: On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind-limb, and on the nature of these fibres. J Physiol 1901;26:173-209.

11. Ansel JC, Armstrong CA, Song I, Quinlan KL, Olerud JE, Caughman SW, Bunnett NW: Interactions of the skin and nervous system. J Investig Dermatol Symp Proc 1997;2:23-26.

12. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI: Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. Science 1984;226:547-549.

13. Holzer P: Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. Neuroscience 1988;24:739-768.

14. 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;4:1606-1615.

15. Tsuchida K, Shigemoto R, Yokota Y, Nakanishi S: Tissue distribution and quantitation of the mRNAs for three rat tachykinin receptors. Eur J Biochem 1990;193:751-757.

16. Hartung HP, Toyka KV: Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release. Eur J Pharmacol 1983;89:301-305.

17. Payan DG, Brewster DR, Goetzl EJ: Specific stimulation of human T lymphocytes by substance P. J Immunol 1983;131:1613-1615.

18. Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, Kieselbach G, Konwalinka G, Braunsteiner H: In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxyterminal substance P. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1989;340:185-190.

19. Pascual DW, Xu-Amano JC, Kiyono H, McGhee JR, Bost KL: Substance P acts directly upon cloned B lymphoma cells to enhance IgA and IgM production. J Immunol 1991;146:2130-2136.

20. Calvo CF, Chavanel G, Senik A: Substance P enhances IL-2 expression in activated human T cells. J Immunol 1992;148:3498-3504.

21. Moll I: Dermatologie. Stuttgart, Thieme, 2005.

22. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA: New insights into atopic dermatitis. J Clin Invest 2004;113:651-657.

23. Barnes PJ, Chung KF, Page CP: Inflammatory mediators of asthma: an update. Pharmacol Rev 1998;50:515-596.

24. Widdicombe JG: Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:S171-175.

25. Lundberg JM, Terenius L, Hokfelt T, Goldstein M: High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man. Neurosci Lett 1983;42:167-172.

26. Karlsson JA, Finney MJ, Persson CG, Post C: Substance P antagonists and the role of tachykinins in non-cholinergic bronchoconstriction. Life Sci 1984;35:2681-2691.

27. Li CG, Rand MJ: Evidence that part of the NANC relaxant response of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. Br J Pharmacol 1991;102:91-94.

28. Gibson SJ, Polak JM, Bloom SR, Sabate IM, Mulderry PM, Ghatei MA, McGregor GP, Morrison JF, Kelly JS, Evans RM, et al.: Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. J Neurosci 1984;4:3101-3111.

29. Moller K, Zhang YZ, Hakanson R, Luts A, Sjolund B, Uddman R, Sundler F: Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. Neuroscience 1993;57:725-732.

30. Holzer P: Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1992;121:49-146.

31. 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;235:251-261.

32. Luger TA: Neuromediators--a crucial component of the skin immune system. J Dermatol Sci 2002;30:87-93.

33. Lotti T, Hautmann G, Panconesi E: Neuropeptides in skin. J Am Acad Dermatol 1995;33:482-496.

34. Schaffer M, Beiter T, Becker HD, Hunt TK: Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair? Arch Surg 1998;133:1107-1116.

35. Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T: Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol 2003;139:1479-1488.

36. Liu PY, Bondesson L, Lontz W, Johansson O: The occurrence of cutaneous nerve endings and neuropeptides in vitiligo vulgaris: a case-control study. Arch Dermatol Res 1996;288:670-675.

37. Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S: Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. Nature 1983;306:32-36.

38. Kotani Y, Hirota Y, Sugiyama K, Joh S, Shibutani T, Matsuura H, Inoki R: Effects of noxious stimuli and anesthetic agents on substance P content in rat central nervous system. Jpn J Pharmacol 1986;40:143-147.

39. Kangawa K, Minamino N, Fukuda A, Matsuo H: Neuromedin K: a novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. Biochem Biophys Res Commun 1983;114:533-540.

40. Moussaoui SM, Le Prado N, Bonici B, Faucher DC, Cuine F, Laduron PM, Garret C: Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: comparison with neurokinin A and substance P and effects of neonatal capsaicin treatment. Neuroscience 1992;48:969-978.

41. Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE: Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. Endocrinology 2000;141:4218-4225.

42. Patacchini R, Maggi CA, Holzer P: Tachykinin autoreceptors in the gut. Trends Pharmacol Sci 2000;21:166.

43. Maggi CA, Meli A: The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. Gen Pharmacol 1988;19:1-43.

44. Lundberg JM: Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. Pharmacol Rev 1996;48:113-178.

45. Patak EN, Pennefather JN, Story ME: Effects of tachykinins on uterine smooth muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol 2000;27:922-927.

46. Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A: Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. Nature 1977;270:741-743.

47. Patacchini R, De Giorgio R, Bartho L, Barbara G, Corinaldesi R, Maggi CA: Evidence that tachykinins are the main NANC excitatory neurotransmitters in the guinea-pig common bile duct. Br J Pharmacol 1998;124:1703-1711.

48. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA: Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. Life Sci 2004;74:1445-1463.

49. Anichini M, Cesaretti S, Lepori M, Maddali Bongi S, Maresca M, Zoppi M: Substance P in the serum of patients with rheumatoid arthritis. Rev Rhum Engl Ed 1997;64:18-21.

50. Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T: Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Pharmacol Rep 2006;58:13-21.

51. Malcangio M, Bowery NG: Peptide autoreceptors: does an autoreceptor for substance P exist? Trends Pharmacol Sci 1999;20:405-407.

52. Kennedy PG, Rodgers J, Bradley B, Hunt SP, Gettinby G, Leeman SE, de Felipe C, Murray M: Clinical and neuroinflammatory responses to meningoencephalitis in substance P receptor knockout mice. Brain 2003;126:1683-1690.

53. Chavolla-Calderon M, Bayer MK, Fontan JJ: Bone marrow transplantation reveals an essential synergy between neuronal and hemopoietic cell neurokinin production in pulmonary inflammation. J Clin Invest 2003;111:973-980.

54. Joos GF, Germonpre PR, Kips JC, Peleman RA, Pauwels RA: Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. Eur Respir J 1994;7:1161-1171.

55. Gerard NP, Bao L, Xiao-Ping H, Gerard C: Molecular aspects of the tachykinin receptors. Regul Pept 1993;43:21-35.

56. Nakanishi S: Mammalian tachykinin receptors. Annu Rev Neurosci 1991;14:123-136.

57. Nakanishi S, Nakajima Y, Yokota Y: Signal transduction and ligand-binding domains of the tachykinin receptors. Regul Pept 1993;46:37-42.

58. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC: Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp Dermatol 1998;7:81-96.

59. Harrison S, Geppetti P: Substance p. Int J Biochem Cell Biol 2001;33:555-576.

60. Di Maria GU, Bellofiore S, Geppetti P: Regulation of airway neurogenic inflammation by neutral endopeptidase. Eur Respir J 1998;12:1454-1462.

61. 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;84:900-906.

62. Sekizawa K, Tamaoki J, Graf PD, Basbaum CB, Borson DB, Nadel JA: Enkephalinase inhibitor potentiates mammalian tachykinin-induced contraction in ferret trachea. J Pharmacol Exp Ther 1987;243:1211-1217.

63. Sheppard D, Thompson JE, Scypinski L, Dusser D, Nadel JA, Borson DB: Toluene diisocyanate increases airway responsiveness to substance P and decreases airway neutral endopeptidase. J Clin Invest 1988;81:1111-1115.

64. Williams TA, Hooper NM, Turner AJ: Characterization of neuronal and endothelial forms of angiotensin converting enzyme in pig brain. J Neurochem 1991;57:193-199.

65. Sakurada T, Tan-No K, Yamada T, Sakurada S, Kisara K: Phosphoramidon potentiates mammalian tachykinin-induced biting, licking and scratching behaviour in mice. Pharmacol Biochem Behav 1990;37:779-783.

66. Wang LH, Ahmad S, Benter IF, Chow A, Mizutani S, Ward PE: Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. Peptides 1991;12:1357-1364.

67. Graf K, Koehne P, Grafe M, Zhang M, Auch-Schwelk W, Fleck E: Regulation and differential expression of neutral endopeptidase 24.11 in human endothelial cells. Hypertension 1995;26:230-235.

68. US VE, Gaddum JH: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J Physiol 1931;72:74-87.

69. Gaddum JH, Schild H: Depressor substances in extracts of intestine. J Physiol 1934;83:1-14.

70. Smith GD, Seckl JR, Sheward WJ, Bennie JG, Carroll SM, Dick H, Harmar AJ: Effect of adrenalectomy and dexamethasone on neuropeptide content of dorsal root ganglia in the rat. Brain Res 1991;564:27-30.

71. Harmar A, Schofield JG, Keen P: Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia. Nature 1980;284:267-269.

72. Harmar A, Keen P: Synthesis, and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation in vitro. Brain Res 1982;231:379-385.

73. Merighi A, Polak JM, Gibson SJ, Gulbenkian S, Valentino KL, Peirone SM: Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. Cell Tissue Res 1988;254:101-109.

74. Plenderleith MB, Haller CJ, Snow PJ: Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. Synapse 1990;6:344-350.

75. Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, Hokfelt T, Nilsson G: Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. Brain Res 1980;191:443-457.

76. Lembeck F: [Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord.]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol 1953;219:197-213.

77. Otsuka M, Yoshioka K: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. Physiol Rev 1993;73:229-308.

78. Hamid Q, Belvisi MG, Stretton D, Rohde J, Harmar AJ, Barnes PJ: Localization of beta pre-protachykinin mRNA in nodose ganglion. Neuropeptides 1991;20:145-150.

79. Kiyama H, Morita Y, Noguchi K, Wang Y, Nakanishi S, Shiotani Y, Tohyama M: Demonstration of rat preprotachykinin A mRNA in the rat trigeminal ganglion by in situ hybridization histochemistry. J Chem Neuroanat 1988;1:125-132.

80. Sternini C: Tachykinin and calcitonin gene-related peptide immunoreactivities and mRNAs in the mammalian enteric nervous system and sensory ganglia. Adv Exp Med Biol 1991;298:39-51.

81. Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, Takami K, Kiyama H, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Emson PC, Tohyama M: Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. Brain Res 1985;330:194-196.

82. Gibbins IL, Furness JB, Costa M: Pathway-specific patterns of the co-existence of substance P, calcitonin gene-related peptide, cholecystokinin and dynorphin in neurons of the dorsal root ganglia of the guinea-pig. Cell Tissue Res 1987;248:417-437.

83. Sternini C, Su D, Gamp PD, Bunnett NW: Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. J Comp Neurol 1995;358:531-540.

84. Lotti T, Bianchi B, Panconesi E: Neuropeptides and skin disorders. The new frontiers of neuro-endocrine-cutaneous immunology. Int J Dermatol 1999;38:673-675.

85. Misery L: Skin, immunity and the nervous system. Br J Dermatol 1997;137:843-850.

86. Habler HJ, Timmermann L, Stegmann JU, Janig W: Involvement of neurokinins in antidromic vasodilatation in hairy and hairless skin of the rat hindlimb. Neuroscience 1999;89:1259-1268.

87. Quinlan KL, Song IS, Bunnett NW, Letran E, Steinhoff M, Harten B, Olerud JE, Armstrong CA, Wright Caughman S, Ansel JC: Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. Am J Physiol 1998;275:C1580-1590.

88. Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH: Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. J Immunol 1993;151:3274-3282.

89. Grando SA: Physiology of endocrine skin interrelations. J Am Acad Dermatol 1993;28:981-992.

90. Niizeki H, Kurimoto I, Streilein JW: A substance p agonist acts as an adjuvant to promote hapten-specific skin immunity. J Invest Dermatol 1999;112:437-442.

91. 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;98:2284-2291.

92. Myers AC, Kajekar R, Undem BJ: Allergic inflammation-induced neuropeptide production in rapidly adapting afferent nerves in guinea pig airways. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002;282:L775-781.

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

94. Joos GF, De Swert KO, Schelfhout V, Pauwels RA: The role of neural inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Ann N Y Acad Sci 2003;992:218-230.

95. Lindsey KQ, Caughman SW, Olerud JE, Bunnett NW, Armstrong CA, Ansel JC: Neural regulation of endothelial cell-mediated inflammation. J Investig Dermatol Symp Proc 2000;5:74-78.

96. Saria A, Lundberg JM, Skofitsch G, Lembeck F: Vascular protein linkage in various tissue induced by substance P, capsaicin, bradykinin, serotonin, histamine and by antigen challenge. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1983;324:212-218.

97. 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;31:138-151.

98. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J: The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in human skin and in the eye and paw of the rat. Br J Pharmacol Chemother 1968;33:32-41.

99. Scholzen TE, Brzoska T, Kalden DH, O'Reilly F, Armstrong CA, Luger TA, Ansel JC: Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormones in the skin: mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation. J Investig Dermatol Symp Proc 1999;4:55-60.

100. Willis WD, Jr.: Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. Exp Brain Res 1999;124:395-421.

101. Lin Q, Wu J, Willis WD: Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. J Neurophysiol 1999;82:2602-2611.

102. Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I: Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. Nature 1985;313:54-56.

103. Brain SD, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I, Williams TJ: Potent vasodilator activity of calcitonin gene-related peptide in human skin. J Invest Dermatol 1986;87:533-536.

104. Amadesi S, Moreau J, Tognetto M, Springer J, Trevisani M, Naline E, Advenier C, Fisher A, Vinci D, Mapp C, Miotto D, Cavallesco 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;163:1206-1211.

105. Szolcsanyi J, Bartho L: Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. Neurosci Lett 1982;34:247-251.

106. Bergren DR: Capsaicin challenge, reflex bronchoconstriction, and local action of substance P. Am J Physiol 1988;254:R845-852.

107. Palecek F, Sant'Ambrogio G, Sant'Ambrogio FB, Mathew OP: Reflex responses to capsaicin: intravenous, aerosol, and intratracheal administration. J Appl Physiol 1989;67:1428-1437.

108. Belmonte C, Gallar J, Pozo MA, Rebollo I: Excitation by irritant chemical substances of sensory afferent units in the cat's cornea. J Physiol 1991;437:709-725.

109. Holzer P: Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. Pharmacol Rev 1991;43:143-201.

110. Szolcsanyi J, Bartho L: New type of nerve-mediated cholinergic contractions of the guinea-pig small intestine and its selective blockade by capsaicin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1978;305:83-90.

111. Nagy JI, Iversen LL, Goedert M, Chapman D, Hunt SP: Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. J Neurosci 1983;3:399-406.

112. Jancso G, Kiraly E, Joo F, Such G, Nagy A: Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. Neurosci Lett 1985;59:209-214.

113. Fitzgerald M, Woolf CJ: The time course and specificity of the changes in the behavioural and dorsal horn cell responses to noxious stimuli following peripheral nerve capsaicin treatment in the rat. Neuroscience 1982;7:2051-2056.

114. Gamse R, Petsche U, Lembeck F, Jancso G: Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. Brain Res 1982;239:447-462.

115. Taylor DC, Pierau FK, Szolcsanyi J: Long lasting inhibition of horseradish peroxidase (HRP) transport in sensory nerves induced by capsaicin pretreatment of the receptive field. Brain Res 1984;298:45-49.

116. Szallasi A, Blumberg PM: Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev 1999;51:159-212.

117. Green BG, Shaffer GS: The sensory response to capsaicin during repeated topical exposures: differential effects on sensations of itching and pungency. Pain 1993;53:323-334.

118. Crimi N, Polosa R, Maccarrone C, Palermo B, Palermo F, Mistretta A: Effect of topical application with capsaicin on skin responses to bradykinin and histamine in man. Clin Exp Allergy 1992;22:933-939.

119. Dasgupta P, Fowler CJ: Chillies: from antiquity to urology. Br J Urol 1997;80:845-852.

120. Szallasi A, Blumberg PM: Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. Pain 1996;68:195-208.

121. Bevan S, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP, Shah K, Walpole CS, Yeats JC: Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. Br J Pharmacol 1992;107:544-552.

122. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 1997;389:816-824.

123. Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D: International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. Pharmacol Rev 2003;55:591-596.

124. Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB: The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. Trends Pharmacol Sci 2002;23:183-191.

125. Clapham DE: TRP channels as cellular sensors. Nature 2003;426:517-524.

126. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, Clapham DE, Harteneck C, Heller S, Julius D, Kojima I, Mori Y, Penner R, Prawitt D, Scharenberg

AM, Schultz G, Shimizu N, Zhu MX: A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. Mol Cell 2002;9:229-231.

127. Geppetti P, Materazzi S, Nicoletti P: The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. Eur J Pharmacol 2006;533:207-214.

128. Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC, Brough SJ, Owen D, Smith GD, Randall AD, Harrison S, Bianchi A, Davis JB, Geppetti P: Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. Nat Neurosci 2002;5:546-551.

129. McVey DC, Vigna SR: The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. Peptides 2001;22:1439-1446.

130. Nathan JD, Patel AA, McVey DC, Thomas JE, Prpic V, Vigna SR, Liddle RA: Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;281:G1322-1328.

131. Dinh QT, Groneberg DA, Mingomataj E, Peiser C, Heppt W, Dinh S, Arck PC, Klapp BF, Fischer A: Expression of substance P and vanilloid receptor (VR1) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa. Neuropeptides 2003;37:245-250.

132. Michael GJ, Priestley JV: Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. J Neurosci 1999;19:1844-1854.

133. Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R: Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. Eur J Neurosci 1999;11:946-958.

134. Jarvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A: Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. Arch Dermatol Res 2003;295:2-7.

135. Roosje PJ, van Kooten PJ, Thepen T, Bihari IC, Rutten VP, Koeman JP, Willemse T: Increased numbers of CD4+ and CD8+ T cells in lesional skin of cats with allergic dermatitis. Vet Pathol 1998;35:268-273.

136. Toyoda M, Makino T, Kagoura M, Morohashi M: Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. Arch Dermatol Res 2000;292:418-421.

137. Bianchi B, Matucci R, Danesi A, Rossi R, Ipponi P, Giannotti B, Johansson O, Cappugi P: Characterization of [3H]substance P binding sites in human skin. J Eur Acad Dermatol Venereol 1999;12:6-10.

138. Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, Sung KJ, Armstrong CA, Ansel JC: Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). Exp Dermatol 2000;9:42-52.

139. Quinlan KL, Naik SM, Cannon G, Armstrong CA, Bunnett NW, Ansel JC, Caughman SW: Substance P activates coincident NF-AT- and NF-kappa B-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization. J Immunol 1999;163:5656-5665.

140. Hsu CH, Chua KY, Huang SK, Chiang IP, Hsieh KH: Glutathione-S-transferase induces murine dermatitis that resembles human atopic dermatitis. Clin Exp Allergy 1996;26:1329-1337.

141. Orr-Urtreger A, Goldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL: Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. J Neurosci 1997;17:9165-9171.

142. Capecchi MR: Altering the genome by homologous recombination. Science 1989;244:1288-1292.

143. Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D: Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science 2000;288:306-313.

144. Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D: The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. Neuron 1998;21:531-543.

145. Emsley JG, Lu X, Hagg T: Retrograde tracing techniques influence reported death rates of adult rat nigrostriatal neurons. Exp Neurol 2001;168:425-433.

146. Ohmura T, Tsunenari I, Hayashi T, Satoh Y, Konomi A, Nanri H, Kawachi M, Morikawa M, Kadota T, Satoh H: Role of substance P in an NC/Nga mouse model of atopic dermatitis-like disease. Int Arch Allergy Immunol 2004;133:389-397.

147. Katsuno M, Aihara M, Kojima M, Osuna H, Hosoi J, Nakamura M, Toyoda M, Matsuda H, Ikezawa Z: Neuropeptides concentrations in the skin of a murine (NC/Nga mice) model of atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2003;33:55-65.

148. Scholzen TE, Steinhoff M, Bonaccorsi P, Klein R, Amadesi S, Geppetti P, Lu B, Gerard NP, Olerud JE, Luger TA, Bunnett NW, Grady EF, Armstrong CA, Ansel JC: Neutral endopeptidase terminates substance P-induced inflammation in allergic contact dermatitis. J Immunol 2001;166:1285-1291.

149. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Bonini S, Manni L: The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases. Allergy 1997;52:883-894.

150. Frossard N, Freund V, Advenier C: Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. Eur J Pharmacol 2004;500:453-465.

151. 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;93:10955-10960.

152. Virchow JC, Julius P, Lommatzsch M, Luttmann W, Renz H, Braun A: Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:2002-2005.

153. 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;34:1474-1479.

154. Peters EM, Handjiski B, Kuhlmei A, Hagen E, Bielas H, Braun A, Klapp BF, Paus R, Arck PC: Neurogenic inflammation in stress-induced termination of murine hair growth is promoted by nerve growth factor. Am J Pathol 2004;165:259-271.

155. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C: Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. Neuroscience 1992;49:693-698.

156. Hunter DD, Myers AC, Undem BJ: Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. Am J Respir Crit Care Med 2000;161:1985-1990.

157. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW: Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. Nat Med 2000;6:151-158.

158. Naukkarinen A, Harvima IT, Aalto ML, Horsmanheimo M: Mast cell tryptase and chymase are potential regulators of neurogenic inflammation in psoriatic skin. Int J Dermatol 1994;33:361-366.

159. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA: Mast cells. Physiol Rev 1997;77:1033-1079.

160. Dinh QT, Cryer A, Dinh S, Trevisani M, Georgiewa P, Chung F, Geppetti P, Heppt W, Klapp BF, Fischer A: Protease-activated receptor 2 expression in trigeminal neurons innervating the rat nasal mucosa. Neuropeptides 2005;39:461-466.

161. Crentsil V: Will corticosteroids and other anti-inflammatory agents be effective for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome? Med Hypotheses 2005;65:97-102.

162. Maunder R: Mediators of stress effects in inflammatory bowel disease: not the usual suspects. J Psychosom Res 2000;48:569-577.

163. 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.

164. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F: The role of substance P in inflammatory disease. J Cell Physiol 2004;201:167-180.

165. Hong D, Byers MR, Oswald RJ: Dexamethasone treatment reduces sensory neuropeptides and nerve sprouting reactions in injured teeth. Pain 1993;55:171-181.

166. Wu C, Sun B, Mao B: [The distribution of substance P in the lungs of asthmatic guinea-pigs and the influence of dexamethasone on the distribution]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 1998;21:16-18.

167. Nagai H, Sakamoto T, Inagaki N, Miura T, Koda A: The effect of prednisolone on substance P-induced vascular permeability in mice. Agents Actions 1992;35:141-148.

168. Scholzen TE, Luger TA: Neutral endopeptidase and angiotensin-converting enzyme -- key enzymes terminating the action of neuroendocrine mediators. Exp Dermatol 2004;13 Suppl 4:22-26.

169. Scholzen TE, Stander S, Riemann H, Brzoska T, Luger TA: Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. J Immunol 2003;170:3866-3873.

170. Hooper NM, Turner AJ: Isolation of two differentially glycosylated forms of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) from pig brain: a re-evaluation of their role in neuropeptide metabolism. Biochem J 1987;241:625-633.

171. Bevan S, Geppetti P: Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. Trends Neurosci 1994;17:509-512.

172. Geppetti P, Del Bianco E, Patacchini R, Santicioli P, Maggi CA, Tramontana M: Low pH-induced release of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive sensory nerves: mechanism of action and biological response. Neuroscience 1991;41:295-301.

173. Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED: Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 1999;400:452-457.

174. Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U: Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:6155-6160.

175. Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V: An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:8400-8405.

176. Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A: Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. Proc Natl Acad Sci U S A 2000;97:3655-3660.

177. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, Dineley KE, Watkins S, Reynolds IJ, Caterina MJ: Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:13396-13401.

178. Inoue K, Koizumi S, Fuziwara S, Denda S, Inoue K, Denda M: Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun 2002;291:124-129.

179. Denda M, Fuziwara S, Inoue K, Denda S, Akamatsu H, Tomitaka A, Matsunaga K: Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. Biochem Biophys Res Commun 2001;285:1250-1252.

180. Cortright DN, Crandall M, Sanchez JF, Zou T, Krause JE, White G: The tissue distribution and functional characterization of human VR1. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:1183-1189.

181. Kido MA, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T: Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. J Dent Res 2003;82:393-397.

182. Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metze D, Steinhoff M: Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. Exp Dermatol 2004;13:129-139.

183. Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Garcia-Sanz N, Ferrer-Montiel A: Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. J Biol Chem 2004;279:25665-25672.

184. Karai LJ, Russell JT, Iadarola MJ, Olah Z: Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca2+-induced Ca2+ release in sensory neurons. J Biol Chem 2004;279:16377-16387.

185. Marshall IC, Owen DE, Cripps TV, Davis JB, McNulty S, Smart D: Activation of vanilloid receptor 1 by resiniferatoxin mobilizes calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores. Br J Pharmacol 2003;138:172-176.

186. Nagy I, Santha P, Jancso G, Urban L: The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. Eur J Pharmacol 2004;500:351-369.

187. Black PH: Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. Brain Behav Immun 2002;16:622-653.

188. Watanabe N, Horie S, Michael GJ, Spina D, Page CP, Priestley JV: Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. Pulm Pharmacol Ther 2005;18:187-197.

189. Dinh QT, Groneberg DA, Peiser C, Mingomataj E, Joachim RA, Witt C, Arck PC, Klapp BF, Fischer A: Substance P expression in TRPV1 and trkA-positive dorsal root ganglion neurons innervating the mouse lung. Respir Physiol Neurobiol 2004;144:15-24.

190. Zhang X, Huang J, McNaughton PA: NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. Embo J 2005;24:4211-4223.

191. Bevan S, Winter J: Nerve growth factor (NGF) differentially regulates the chemosensitivity of adult rat cultured sensory neurons. J Neurosci 1995;15:4918-4926.

192. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D: Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. Nature 2001;411:957-962.

193. Hwang SJ, Oh JM, Valtschanoff JG: Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. Brain Res 2005;1047:261-266.

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. A. Fischer, Leiter der klinischen Forschergruppe Allergologie des Campus Virchow-Klinikum der Charité zu Berlin, in dessen Abteilung diese Dissertation durchgeführt werden konnte.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Q.T. Dinh danke ich besonders für die persönliche Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für seine sehr große Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche.

Durch die weit reichende Unterstützung im Labor von Frau L. Kirchhof, Frau L. Cifuentes und Frau Dr. med. R. Joachim konnte der experimentelle Teil meiner Arbeit zügig und effizient absolviert werden. Hierfür meinen herzlichen Dank.

Des Weiteren danke ich meinem Freund Karl Zeil für sein Verständnis und seine Mithilfe bei der Korrektur und die vielen wertvollen Hinweise.

Allen, auch ungenannten Förderern dieser Dissertation gilt ebenso mein herzlichster Dank.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Sabine Sander, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Quantitative Veränderung der Substanz P-Produktion dermaler Neurone nach Sensibilisierung von $TRPV_1$-knockout Mäusen“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

07.10.2008 Sabine Sander