

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und  
Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Die Rolle der Neurotrophine und die Aktivierung Dendritischer  
Zellen bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martina Altenähr  
aus Erlangen

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. N. Suttorp  
2.: Prof. Dr. med. E. Hamelmann  
3.: Prof. Dr. med. J.-Ch. Virchow

Datum der Promotion: 19.09.08

Für meinen Sohn Friedrich

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>1 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinitis</b> .....	<b>13</b>
1.1.1. Die allergische Sofortreaktion .....	14
1.1.2 Die allergische Spätphasenreaktion und Gewebsveränderungen .....	15
<b>1.2 Die Neurotrophine und ihre Rezeptoren</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Geschichte .....	16
1.2.2 Aufbau, Eigenschaften und Expression .....	17
1.2.2.1 NGF (nerve growth factor) .....	17
1.2.2.2 BDNF (brain derived neurotrophic factor) .....	18
1.2.2.3 NT-3 (Neurotrophin-3) und NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) .....	19
1.2.2 Die Neurotrophin-Rezeptoren .....	19
1.2.2.1 Der TrkA-Rezeptor .....	20
1.2.2.2 Der TrkB Rezeptor .....	21
1.2.2.3 Der TrkC-Rezeptor .....	21
1.2.2.4 Der p75 <sup>NTR</sup> Rezeptor .....	22
1.2.2.5 Aufbau der Rezeptoren .....	22
1.2.2.6 Signaltransduktionswege .....	23
1.2.2.7 Interaktion der Rezeptoren und Internalisierung .....	25
1.2.3 Rolle der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren im Immunsystem .....	25
1.2.4 Erkrankungen mit veränderter Neurotrophin-Expression .....	26
1.2.5 Expression von Neurotrophinen in der Lunge .....	27
1.2.6 Rolle der Neurotrophine bei allergischen Erkrankungen - bisherige Erkenntnisse .....	27
1.2.7 Das Prinzip der neurogenen Entzündung beim allergischen Asthma bronchiale – Rolle der Neurotrophine .....	29
<b>1.3 Die Dendritischen Zellen</b> .....	<b>31</b>
1.3.1 Geschichte .....	31
1.3.2 Morphologie, Herkunft und Eigenschaften .....	32
1.3.2.1 Funktion .....	32
1.3.2.2 Herkunft und Einteilung .....	33
1.3.2.3 T-Zell-Aktivierung .....	35
1.3.2.4 Oberflächenmoleküle von Monozyten und Dendritischen Zellen .....	36
1.3.2.5 Oberflächenmoleküle und Rezeptoren der Dendritischen Zellen .....	37
1.3.2.6 Gruppierungen der Dendritischen Zellen und spezifische Oberflächenmoleküle und Rezeptoren .....	37
1.3.2.7 Dendritische Zellen der Lunge – Beteiligung beim allergischen Asthma .....	41

1.3.2.8 Rolle der Dendritischen Zellen beim allergischen Asthma bronchiale ...	41
1.3.2.9 Rolle von Antigenpräsentierenden Zellen bei der Produktion von Neurotrophinen.....	43
1.3.2.10 Die GTPasen – Bedeutung für die Funktion Dendritischer Zellen .....	43
<b>1.4 Inflammatorische Zytokine – inflammatorische Stimuli .....</b>	<b>45</b>
1.4.1 Interleukin-4 .....	46
1.4.2 Interleukin-6 .....	46
1.4.3 Interleukin-10 .....	47
1.4.4 Interleukin-12 .....	47
1.4.5 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	48
1.4.6 Transforming Growth Factor- $\beta$ .....	48
<b>1.6 Zielsetzung.....</b>	<b>49</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>51</b>
2.1.1 Materialien für Zellseparation und Zellkultur.....	51
2.1.1.1 ex vivo generierte CD16 <sup>+</sup> Monozyten und ex vivo isolierte Langerhanszellen .....	51
2.1.1.2 Isolation von Monozyten und Langerhanszellen.....	51
2.1.1.3 Medium und Zytokine für Zellkultur.....	51
2.1.1.4 Lösungen und Puffer .....	51
2.1.2 Materialien für FACS und Immunfluoreszenz.....	52
2.1.3 Materialien für Western Blot.....	52
2.1.3.1 Probengewinnung für Western Blot.....	52
2.1.3.2 Proteinbestimmung.....	52
2.1.3.3 Western Blot.....	52
2.1.4 Material für PCR.....	53
2.1.4.1 RNA-Isolation .....	53
2.1.4.2 Reverse Transkription .....	53
2.1.4.3 PCR.....	53
2.1.4.4 Übersicht der Primer.....	54
2.1.4.5 Agarose-Gelelektrophorese DNA .....	54
2.1.5 Materialien für ELISA .....	54
2.1.5.1 Lösungen.....	54
2.1.5.2 Lösungen für TNF- $\alpha$ -ELISA.....	55
2.1.5.3 Lösungen für TGF- $\beta$ ELISA.....	55
2.1.5.4 Übersicht der verwendeten Antikörper .....	55
2.1.6 Material Immunpräzipitation .....	56
2.1.7 Material Rho und Rac Pull down assay.....	56
2.1.8 Laborgeräte.....	56
2.1.9 Sonstige Materialien.....	57
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>58</b>
2.2.1 Probandenkollektiv.....	58

2.2.1.1	Blutspender .....	58
2.2.1.2	Spender für Hautmaterial.....	58
2.2.2	Zellseparation und Generierung Dendritischer Zellen aus peripheren CD14 <sup>+</sup> Monozyten .....	58
2.2.2.1.	Gewinnung mononukleärer Zellen mit Ficoll Histopaque.....	58
2.2.2.2	Immunomagnetische Isolation von peripheren CD14 <sup>+</sup> Monozyten mittels MACS (magnet associated cell sorter) .....	59
2.2.2.3	Zellzahlbestimmung.....	59
2.2.2.4	Immunoselektion .....	60
2.2.3	Zellkultur .....	61
2.2.3.1	Generierung von unreifen MoDCs aus peripheren CD14 <sup>+</sup> Monozyten ...	61
2.2.3.2	Differenzierung von unreifen MoDCs zu reifen Dendritischen Zellen ...	61
2.2.4	Durchflußzytometrie .....	61
2.2.4.1	Intrazellulärer Nachweis von NGF, BDNF und NT-3 .....	62
2.2.4.2	Nachweis der hochaffinen spezifischen Neurotrophin-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen.....	62
2.2.4.3	Bestimmung der Reinheit und Viabilität.....	63
2.2.5	PCR (polymerase chain reaction) .....	63
2.2.5.1	Gewinnung der Gesamt-RNA.....	64
2.2.5.3	Reverse Transkription .....	64
2.2.5.4	PCR und Agarose-Gelelektrophorese .....	65
2.2.6	SDS-PAGE und Western Blot .....	65
2.2.6.1	Gewinnung von Zelllysaten und Proteinbestimmung .....	66
2.2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	67
2.2.6.3	Durchführung SDS-PAGE und Western Blot.....	67
2.2.7	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	69
2.2.7.1	Durchführung.....	69
2.2.7.2	Statistische Auswertung .....	71
2.2.8	Immunfluoreszenz.....	71
2.2.9	Nachweis der Rezeptorphosphorylierung – Immunpräzipitation .....	72
2.2.10	Rho und Rac GTPase pull down assay.....	72
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellseparation und Zellkultur.....</b>	<b>75</b>
3.1.1	Gewinnung peripherer CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	75
3.1.2	Langerhanszellen.....	75
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur .....</b>	<b>75</b>
3.2.1	Durchflusszytometrie.....	76
3.2.2	Immunfluoreszenz - Detektion von fluoreszierenden Neurotrophinen and Rezeptoren auf humanen MoDCs.....	76
<b>3.3</b>	<b>RNA-Isolation und RT-PCR.....</b>	<b>79</b>
<b>3.4</b>	<b>SDS-PAGE und Western Blot .....</b>	<b>80</b>
<b>3.5</b>	<b>Trk Rezeptor-Phosphorylierung .....</b>	<b>81</b>

<b>3.6 Rho und Rac pull down assay</b> .....	<b>82</b>
<b>3.7 Ergebnisse der ELISA-Messungen</b> .....	<b>83</b>
3.7.1 Neurotrophinspeicherung und –freisetzung aus Dendritischen Zellen .....	83
3.7.2 Freisetzung von Mediatoren durch Dendritische Zellen .....	86
<b>3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse</b> .....	<b>89</b>
<b>4 DISKUSSION</b> .....	<b>90</b>
<b>4.1 Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>90</b>
4.1.2 Auswirkungen der Ergebnisse auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen.....	93
4.1.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Migration und T-Zell-Interaktion .....	96
<b>4.2 Dendritische Zellen, Neurotrophine und die neurogene Entzündung</b> .....	<b>98</b>
<b>4.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Hygiene-Hypothese</b> .....	<b>101</b>
<b>4.4 Ausblick</b> .....	<b>103</b>
<b>5 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>105</b>
<b>6. ANHANG</b> .....	<b>118</b>
<b>6.1 Danksagung</b> .....	<b>118</b>
<b>6.2 Lebenslauf</b> .....	<b>119</b>
<b>6.3 Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>120</b>

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Bei Dendritischen Zellen handelt es sich um Antigenpräsentierende Zellen, die an der Schlüsselstelle zwischen Körper und Außenwelt stehen. Durch Aufnahme und Prozessierung von in den Körper eingedrungenen Fremdartigen können sie eine adaptive Immunantwort in Gang setzen. In den letzten Jahren sind sie auf dem Gebiet der Allergologie immer mehr in den Fokus des Interesses gerückt. Die bei Allergien überwiegende TH2-Antwort auf Allergene ist zum großen Teil auf eine Sensibilisierung durch Dendritische Zellen zurückzuführen. Die Neurotrophine, Proteine, bei denen man zunächst annahm, dass sie ihre hauptsächliche Rolle im Nervensystem spielen, sind bei Allergikern und Asthmatikern sowohl im Blut als auch in durch BAL (bronchioalveoläre Lavage) gewonnener Flüssigkeit erhöht nachgewiesen worden. Dies warf die Frage auf, inwieweit zwischen Dendritischen Zellen und Neurotrophinen ein Zusammenhang besteht. **Methoden:** Die Dendritischen Zellen wurden aus Monozyten generiert, welche aus dem Blut allergischer sowie gesunder Probanden isoliert worden waren. Durch 7tägige Zellkultur in Medium mit IL-4 und GM-CSF bildeten sich MoDCs (*monocyte derived dendritic cells*). Um Neurotrophine und ihre hochaffinen spezifischen Rezeptoren der MoDCs nachzuweisen, wurden FACS, ELISA und Western Blot verwendet. Die Untersuchung von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren kodierender mRNA wurde mit rt-PCR durchgeführt. Um die Rezeptoraktivierung und Signaltransduktionswege Dendritischer Zellen zu evaluieren, wurden eine Immunpräzipitation und ein *Rho/Rac pull down assay* verwendet. Für die ELISA- und Western Blot-Untersuchungen wurden zwei verschiedene Probandengruppen gebildet, Allergiker und Nichtallergiker. **Ergebnisse:** Die Untersuchungen wiesen die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 sowie die hochaffinen spezifischen Rezeptoren mittels FACS und Immunfluoreszenz auf intakten Zellen nach. Auf Proteinebene konnten NGF und BDNF sowie TrkA und TrkB nachgewiesen werden. NGF und BDNF wurden vor allem bei Allergikern selektiv durch LPS hochreguliert. Die Banden im Bereich von TrkA und TrkB zeigten bei Allergikern ebenfalls eine stärkere Intensität nach Stimulation mit LPS. Die rt-PCR zeigte für die Neurotrophine NGF



und BDNF positive Ergebnisse. TrkB wurde durch Stimulation mit LPS und CD40L selektiv hochreguliert. Bei der quantitativen Analyse mittels ELISA zeigte sich, dass vor allem BDNF nach LPS- und Allergenstimulation signifikant erhöht war, während die Produktion von NGF kaum beeinflussbar war. Die Unterscheidung zwischen Allergikern und Nichtallergikern spielte hier keine Rolle. Nach Stimulation mit den Neurotrophinen NGF und BDNF konnte mittels Immunpräzipitation eine Rezeptorphosphorylierung von TrkA und TrkB nachgewiesen werden. Im *Rho/Rac pull down assay*, dass die GTPasen RhoA und Rac von NGF und BDNF unterschiedlich reguliert werden. Während RhoA durch BDNF hochreguliert und von NGF herunterreguliert wurde, wurde Rac durch NGF hochreguliert und durch BDNF herunterreguliert. Die Messung verschiedener Zytokine in den Überständen mittels ELISA zeigte bei Allergikern ein erhöhtes IL-6, während bei Nichtallergikern IL-10 erhöht vorlag.

**Schlussfolgerung:** Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Rolle der durch Dendritische Zellen produzierten Neurotrophine beim allergischen Asthma bronchiale hin. Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass die Dendritischen Zellen sowohl auf Stimulation mit Neurotrophinen reagieren als auch als Produktionsquelle für Neurotrophine fungieren. Vor allem TrkB und BDNF sind durch Stimulation mit LPS hochregulierbar, was darauf hindeuten könnte, dass BDNF einen Botenstoff darstellt, der an der Sensibilisierung von TH2-Zellen mitwirkt. Aus dem Ergebnis der Immunpräzipitation lässt sich ableiten, dass NGF und BDNF durch TrkA und TrkB ihre Wirkungen auf Dendritische Zellen ausüben. Die Antwort der DCs auf Stimulation mit NGF und BDNF, die bei Allergikern in einem erhöhten IL-6 und bei Nichtallergikern in einem erhöhten IL-10 besteht, deutet darauf hin, dass die Neurotrophine eine Rolle bei dem bei Allergien vorherrschenden zellulären Ungleichgewicht spielen könnten. Da es sich bei diesen Zellen um *monocyte derived DCs* handelt, ist es unwahrscheinlich, dass sie schon mit Allergenen sensibilisiert sind. Hieraus lässt sich schließen, dass vererbte Ursachen bei der Entstehung allergischer Erkrankungen mitwirken. Die Ergebnisse des *Rho/Rac pull down assays* deuten darauf hin, dass NGF und BDNF unterschiedliche Funktionen hinsichtlich essentieller Funktionen der Dendritischen Zellen wie die Ausbildung von Dendriten und Migration ausüben.

Schlagwörter: NGF, BDNF, NT-3, Dendritische Zellen, LPS, Allergie

## Abstract

**Background:** Dendritic Cells (DC) are antigen presenting cells which play a key role in the defense of antigens that invade the body. By uptake and processing of foreign antigens they can trigger the adaptive immune response. In the pathogenesis of allergy they may play a pivotal role by sensitizing T helper cells to become Th2 cells, which are essential for the development of allergic diseases. The neurotrophins among which the best known members are NGF, BDNF and NT-3 are proteins that play an important role in the development and plasticity of the nervous system. In recent years one became aware that they also may be important in the development of allergic diseases as they were found in increased amounts in blood and BALF (bronchoalveolar lavage fluid) in allergics and asthmatics. The intention of these investigations was to find out whether DCs and neurotrophins interact with each other. A group of allergics was compared to a group of non allergics. **Methods:** The DCs were generated from monocytes isolated from peripheral blood from allergics and non allergics. By 7 day cell culture with medium, IL-4 and GM-CSF the monocytes turned into DCs and were therefore called MoDCs (*monocyte derived DCs*). In order to evaluate if Dendritic Cells express neurotrophins ELISA, Western Blot and PCR were used. A group of allergics was compared to a group of nonallergics. Furthermore immunofluorescence was used in order to detect neurotrophins on whole DCs and immunoprecipitation to find out whether the neurotrophin high affinity receptors were activated on DCs. A Rho/Rac pull down assay was used in order to investigate the signal transduction way through which neurotrophins act in Dendritic Cells. **Results:** By immunofluorescence and FACS NGF, BDNF and NT-3 could be detected on whole cells. On the protein level NGF, BDNF, TrkA and TrkB could be found. NGF and BDNF were selectively upregulated by stimulation with LPS, especially in allergics. Also TrkA and TrkB showed a stronger intensity in allergics after stimulation with LPS. In the PCR could be shown that DCs are a source of NGF and BDNF, whereas among the receptors only TrkB could be seen after stimulation with LPS. With ELISA there could be shown that BDNF was significantly upregulated by stimulation with LPS and allergen whereas NGF showed no such effect. There were no significant

differences between allergics and non allergics. Among the interleukins IL-6 was upregulated in allergics and IL-10 was upregulated in non allergics after stimulation with LPS and allergen. After stimulation with neurotrophins a receptor phosphorylation could be detected by immunoprecipitation. With the Rho/Rac pull down assay, different regulation of the GTPases Rho and Rac by NGF and BDNF could be seen. RhoA was upregulated by BDNF and downregulated by NGF. Rac was upregulated by NGF and downregulated by BDNF. **Conclusions:** These results show a possible role of the neurotrophins produced by DCs. Both a reaction of DCs on stimulation with neurotrophins and production of neurotrophins by DCs could be shown. Particularly BDNF and TrkB were upregulated by stimulation with LPS and allergen. This could indicate a possible role of this neurotrophin in sensitizing th2 cells. The results of the immunoprecipitation show that NGF and BDNF act on DCs through TrkA and TrkB. The altered production of the cytokines IL-6 and IL-10 could be a sign of neurotrophins being one of the triggers of the cellular imbalance in the pathogenesis of allergic diseases. As the DCs were monocyte derived DCs, they could no have been sensitized with allergen. This suggests genetic causes in the development of allergy. The different regulation of the cell cycle proteins RhoA and Rac indicate different roles of NGF and BDNF in the formation of essential processes like the formation of dendrites and migration.

Key words: NGF, BDNF, NT-3, Dendritic Cells, allergy

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i> Pathogenese des allergischen Asthmas	14
<i>Abb.2:</i> Die Bindung der Neurotrophine an ihre Rezeptoren setzt verschiedene Signaltransduktionsmechanismen in Gang	22
<i>Abb.3:</i> unreife und reife Dendritische Zelle	30
<i>Abb.4:</i> Differenzierungswege der Dendritischen Zellen	38
<i>Abb. 5:</i> Monozyten, Tag 1 und Tag 6 der Stimulation	
<i>Abb.6:</i> Immunfluoreszenz und FACS. Neurotrophine auf DCs	74
<i>Abb.7:</i> Die hochaffinen spezifischen Rezeptoren	75
<i>Abb. 8:</i> PCR NFG und BDNF – Stimulation mit LPS und CD40L	76
<i>Abb.9:</i> PCR TrkA und TrkB – Stimulation mit LPS und CD40L	77
<i>Abb. 10:</i> Western Blot NGF und BDNF – Stimulation mit LPS	78
<i>Abb.11:</i> Western Blot TrkA und TrkB – Stimulation mit LPS	78
<i>Abb.12</i> Immunpräzipitation und Gelelektrophorese TrkA und TrkB	79
<i>Abb.13:</i> Rho und Rac Pull Down Assay	80
<i>Abb. 14:</i> ELISA BDNF und NGF der Zelllysate nach Stimulation mit LPS und Allergen	82
<i>Abb.15:</i> ELISA BDNF und NGF der Zellkulturüberstände nach Stimulation mit LPS und Allergen	83
<i>Abb.16:</i> Messung von Mediatoren in Zellkulturüberständen nach 24h Stimulation mit NGF oder BDNF (n=14)	84

---

<i>Abb. 17:</i> ELISA IL-6 der Zellkulturüberstände nach Stimulation mit NGF und BDNF	85
<i>Abb. 18:</i> ELISA IL-10 der Zellkulturüberstände nach Stimulation mit NGF und BDNF	86

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BAL	bronchioalveoläre Lavage
BALF	<i>bronchioalveolar lavage fluid</i>
Basophile	Basophile Granulozyten
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaar
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CGRP	<i>calcitonin gene related peptide</i>
CIPA	<i>congenital insensitivity to pain and anhidrosis</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DC-SIGN	<i>DC specific ICAM-1 grabbing nonintegrin</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
ECP	<i>eosinophilic cationic protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Eosinophile	Eosinophile Granulozyten
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calv serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GEF	<i>guanosin nucleotide exchange factor</i>
HEPES	2-(N-Hydroxyethylpiperazin)-2'-Ethansulfonsäure
HMC-1	Humane Mastzelllinie 1
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
JAK	Januskinase

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
LPS	Lipopolysaccharid
NANC	<i>non adrenergic non cholinergic</i>
MoDCs	<i>monocyte derived dendritic cells</i>
NKA	Neurokinin A
NK	Neurokininrezeptor
NLF	<i>nasal lavage fluid</i>
NT-3	Neurotrophin-3
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin <sub>2</sub>
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvenylidenfluorid
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCR	<i>t cell receptor</i>
TEMED	Tetraethylmethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TH	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Trk	<i>tropomyosin related kinase</i>
ZNS	Zentralnervensystem

## 1 Einführung

### 1.1 Das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinitis

Das allergische Asthma bronchiale ist eine Erkrankung, die immer mehr Teile der westlichen Bevölkerung betrifft. Dennoch wird sie bislang nicht vollständig verstanden und ist teils schwierig zu behandeln. Ihre Inzidenz hat sich in den westlichen Ländern innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte verdoppelt und die Kosten übersteigen weltweit schätzungsweise die von TBC und HIV/AIDS zusammen. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch rezidivierende Anfälle mit Luftnot, Kurzatmigkeit, Husten und Engegefühl in der Brust. Die diesen Symptomen zugrunde liegende bronchiale Obstruktion, die auf dem Boden von Hypertrophie der glatten Muskelzellen, Ödem, Hypersekretion und Viskositätszunahme des Bronchialsekrets entsteht, ist in der Regel reversibel und ist mit einer erhöhten bronchialen Hyperreagibilität vergesellschaftet. Sowohl spezifische Stimuli wie Allergene als auch unspezifische Stimuli wie Kälte, Anstrengung oder Rauch, chemische oder pharmakodynamische Reize können oben genannte Symptome verursachen [1].

Bei der allergischen Rhinitis, im Volksmund auch Heuschnupfen genannt, kommt es zu denselben immunologischen Vorgängen wie beim allergischen Asthma, die Lokalisation ist allerdings auf die Nase beschränkt. Die beiden Erkrankungen treten häufig gemeinsam auf. Auch andere Erkrankungen des atopischen Formenkreises wie Urtikaria und Neurodermitis sind häufig mit dem allergischen Asthma assoziiert. Als Ursachen der Entstehung allergischer Erkrankungen werden zum einen genetische Faktoren diskutiert, zum anderen umweltbedingte Auslöser. Nach der „*hygiene hypothesis*“ führt eine mangelhafte Auseinandersetzung mit Krankheitserregern in der Kindheit zu einer erhöhten Allergiewahrscheinlichkeit [2]. Auf der anderen Seite gelten virale Infektionen in der Kindheit wie beispielsweise durch RSV ebenfalls als Risikofaktor für die spätere Entstehung eines allergischen Asthmas [3,4]. Im Gegensatz zu der Hypersensibilität vom verzögerten Typ bei Autoimmunerkrankungen und dem IMDD (insulinabhängiger Diabetes mellitus) sind das allergische Asthma bron-



chiale und die allergische Rhinitis durch eine Hyperaktivierung der humoralen Immunantwort, also einer TH2-Antwort gekennzeichnet.

### 1.1.1. Die allergische Sofortreaktion

Beim allergischen Asthma und der allergischen Rhinitis handelt es sich um eine IgE-vermittelte allergische Sofortreaktion (Typ I-Reaktion). Die Ursache für eine erhöhte IgE-Ausschüttung liegt in einer unangemessenen Auseinandersetzung des Immunsystems mit Antigenen, wie zum Beispiel Hausstaubmilben, Pflanzenpollen, Pilzsporen, Tierepithelien, Insektengifte, Nahrungsmittel oder Medikamente. Diese werden von Phagozyten internalisiert und fragmentiert und schließlich den naiven T-Zellen präsentiert, die dadurch eine funktionelle Reifung erfahren. Die Pathogenese des allergischen Asthmas ist stark davon abhängig, welche Klasse von T-Zellen gebildet wird. Eine TH2-Antwort ist charakteristisch für allergische Erkrankungen. Durch die Bildung von TH2-Zytokinen wie IL-4 und IL-13 durch Antigenpräsentierende Zellen kommt es zu dem TH-2-Shift [5]. Die TH2-Zellen schütten wiederum IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 aus. Nachfolgend kommt es zu einer Aktivierung von B-Lymphozyten, die zu Plasmazellen differenzieren und schließlich IgE produzieren. Das gegen ein spezifisches Antigen gerichtete IgE-Molekül bindet nun an Oberflächenrezeptoren von Mastzellen und basophilen Granulozyten. Beim Zweitkontakt mit dem entsprechenden Allergen rufen dann die auf diese Weise sensibilisierten Effektorzellen durch Ausschüttung von Histamin, Heparin, PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>, Tryptase und anderen Mediatoren, die für das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinitis charakteristischen Symptome wie Inflammation, Hypersekretion und Vasodilatation mit Ödembildung hervor. Auch die TH2-Zellen tragen durch Ausschüttung von Mediatoren wie IL-4, IL-5, GM-CSF und Eotaxin entscheidend zu einer Aktivierung und Differenzierung von Mastzellen bei [6-8]. Die Symptome der Hyperreagibilität und Obstruktion entwickeln sich ebenfalls auf dem Boden dieser inflammatorischen Prozesse, wobei deren Zustandekommen immer noch nicht vollständig verstanden ist.

### 1.1.2 Die allergische Spätphasenreaktion und Gewebsveränderungen

Während der allergischen Spätphasenreaktion findet eine massive Infiltration der Lunge mit Entzündungszellen statt. Bei häufiger Allergenexposition entwickelt sich eine chronische Entzündung der Atemwege. Eines der wichtigsten Merkmale der allergischen Spätphasenreaktion stellt die eosinophile Entzündung dar. Die Eosinophilen Granulozyten regen Drüsenzellen zur Schleimproduktion an und sezernieren Substanzen wie Thromboxan B<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und LTB<sub>4</sub>, die eine chemotaktische Wirkung besitzen. Untersuchungen von Biopsien der Bronchien sowie der Nasenschleimhaut zeigen Infiltrate aus Eosinophilen Granulozyten, ein Mukosaödem, eine Verdickung der Basalmembran und Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur.

So entsteht das allergische Asthma bronchiale auf dem Grund eines Zusammenspiels verschiedenster immunologischer Prozesse. Doch nicht nur immunologische Vorgänge spielen beim allergischen Asthma bronchiale eine Rolle, sondern auch nervale Prozesse. So folgt dem Gewebsumbau durch chronische Entzündung eine chronische Obstruktion und Hyperreagibilität. Da das pulmonale Nervensystem unter anderem die Schleimproduktion, mikrovaskuläre Permeabilität und die Rekrutierung von Entzündungszellen reguliert, kann es seinerseits die Entzündung der Atemwege mit bedingen [9].

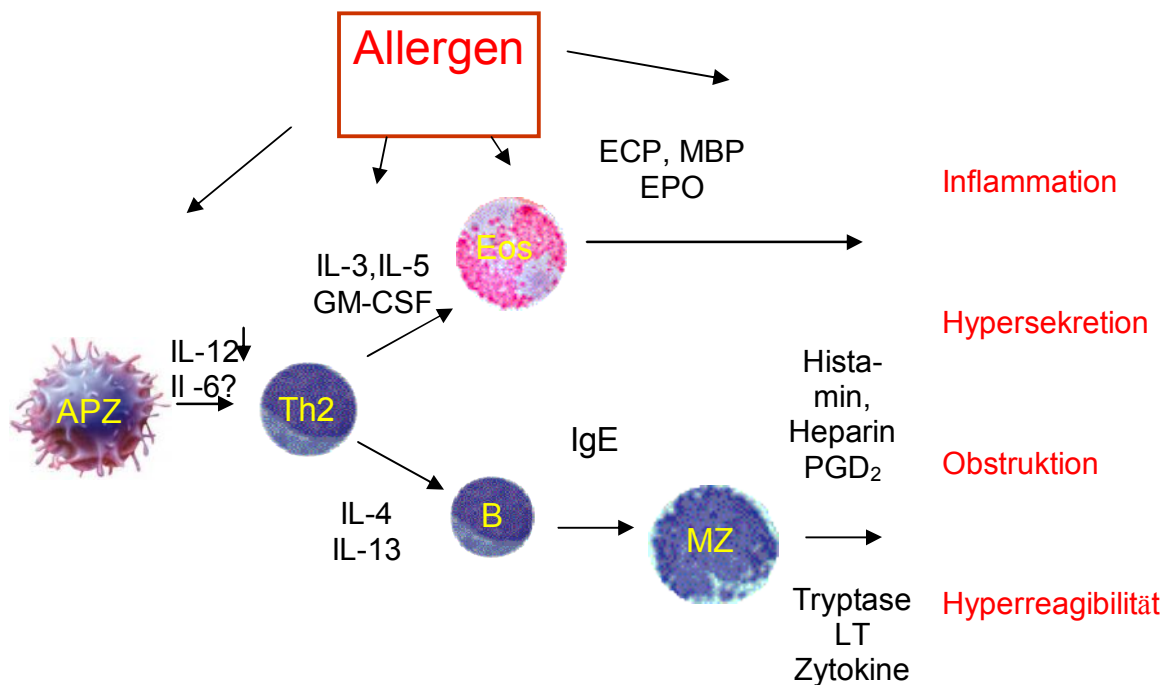


Abb. 1: Pathogenese des allergischen Asthmas

## 1.2 Die Neurotrophine und ihre Rezeptoren

### 1.2.1 Geschichte

Die Neurotrophine wurden erstmals im Zusammenhang mit dem Nervensystem von Säugetieren beschrieben. NGF (*nerve growth factor*) wurde zuerst entdeckt. Rita Levi-Montalcini et al. entdeckten in den 1950er Jahren das Protein, dem zunächst vor allem neurotrophe Fähigkeiten im sensorischen peripheren Nervensystem zugeschrieben wurden [10]. In den darauffolgenden Jahrzehnten wurden BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*) und NT-4/5 (*neurotrophin-4/5*) klassifiziert. Die Neurotrophine NT-6 und NT-7 konnten bisher nur in Fischen identi-

ziert werden, deshalb wird ihnen in dieser Arbeit keine weitere Aufmerksamkeit geschenkt [11,12]. Da NGF und BDNF die beiden wichtigsten Vertreter der Neurotrophine sind, wurde diese Arbeit im Wesentlichen hierauf beschränkt. Sie ähneln sich hinsichtlich ihrer Struktur, Rezeptoraffinität sowie physiologischer Aktivität. Die Neurotrophine sind essentiell für die Entwicklung des Nervensystems der Wirbeltiere. Sie sind wichtige Mitspieler bei der Regulierung von Überleben, Tod, Differenzierung und Entwicklung von Neuronen. Zu ihren Wirkungsbereichen gehören axonales und dendritisches Wachstum, Reorganisation des Zytoskeletts, die Bildung und Funktion von Synapsen, Membraninteraktionen und andere Funktionen, die essentiell für das Überleben und die Plastizität des Nervensystems notwendig sind [13]. Zunächst ging man davon aus, dass sie ihre hauptsächliche Rolle bei der Plastizität und dem Überleben peripherer sensorischer Neuronen spielen, doch 40 Jahre später wurde entdeckt, dass sie auch im Zentralnervensystem agieren und nicht zuletzt auch als Botenstoffe im Immunsystem fungieren [14]. Die Neurotrophine weisen eine hohe Homologie untereinander auf, teilweise bis zu 50%. Die allen Neurotrophinen gemeinsame Struktur ist vermutlich wichtig für die Bindung an den niedrigaffinen Neurotrophinrezeptor p75 [15].

### 1.2.2 Aufbau, Eigenschaften und Expression

#### 1.2.2.1 NGF (*nerve growth factor*)

NGF ist das mit Abstand bestcharakterisierte Neurotrophin. Zunächst wurde es aus Mäusesarkomen, Speicheldrüsen von Mäusen und Schlangengift gewonnen [16].

NGF ist ein Protein mit hohem Molekulargewicht und einem 130-140 kDa schweren Komplex, der sich aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zusammensetzt. Die  $\beta$ -Untereinheit ist verantwortlich für seine biologische Aktivität [17]. Das  $\beta$ -NGF-Gen ist beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert und kodiert ein 34 kDa schweres Vorläuferprotein, das pre-pro-NGF. Dieser Vorläufer wird zu Pro-NGF gespalten und dann durch Pro-Convertase in biologisch aktives  $\beta$ -NGF umgewandelt, ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. NGF trägt zum einen einen entscheidenden Teil zum Überleben sympathischer und sensorischer Nervenfasern bei,

zum anderen spielt es eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Aufrechterhaltung und Regenerierung von reifen peripheren Neuronen [18]. Knock-out-Mäuse, denen das Gen für NGF fehlt, zeigen schwere Defizite in cholinergen Neuronen des basalen Frontalhirns [19]. Crowley et al. untersuchten ebenfalls für NGF-Mangel homozygote Mäuse und stellten fest, dass der NGF-Mangel in einem Verlust an sympathischen und sensorischen Nervenfasern resultiert. Dieser Verlust kann auch nicht durch andere Neurotrophine ausgeglichen werden [20]. NGF induziert in reifen sensorischen Neuronen eine Ausschüttung von Neuropeptiden [21]. Ferner fördert es die Regeneration von Axonen im sensiblen peripheren Nervensystem [22]. In nozizeptiven Neuronen stellt NGF einen Faktor für die neuronale Entwicklung dar. Neuronen des Spinalganglions, die Neuropeptide wie Substanz P enthalten, überleben nicht, wenn ihnen während ihrer Entwicklung NGF vorenthalten wird [23]. Wenn hingegen reifen Neuronen NGF entzogen wird, werden die Neuropeptide nur herunterreguliert. Dieser Effekt scheint auf Neuronen geringen Durchmessers beschränkt zu sein [24]. Im Hinterhorn des Rückenmarks ist NGF in der Lage, eine erhöhte Produktion von BDNF zu induzieren [25].

### *1.2.1.2 BDNF (brain derived neurotrophic factor)*

Zwei Jahrzehnte nach der spektakulären Entdeckung von NGF wurde BDNF von Barde et al. identifiziert [26]. Zu BDNF gibt es insgesamt deutlich weniger Untersuchungen als zu NGF. Ähnlich wie NGF ist auch BDNF ein essentieller Mediator neuronaler Aktivität und synaptischer Plastizität des zentralen und peripheren Nervensystems [13]. Seine Wirkungen umfassen dendritisches und axonales Wachstum [27] sowie eine aktivitätsabhängige synaptische Entwicklung dopaminerger, cholinerg und serotonerger Neuronen des Zentralnervensystems [28]. Durch Mikroglia produziertes BDNF ist ein wichtiges Signalmolekül zwischen Mikroglia und Neuronen. Dies spielt vor allem beim neuropathischen Schmerz eine Rolle [29]. In hippocampalen Synapsen, die an Lernen und Gedächtnis beteiligt sind, zeigt BDNF modulatorische Aktivität [30]. Diverse Studien haben gezeigt, dass BDNF an der Aktivität der Synapsen zwischen primären sensorischen Neuronen und dem Hinterhorn des Rückenmarks beteiligt ist [31]. Bei durch Entzündungen hervorgerufenen Schmerz-

zuständen fanden Kerr et al. deutlich erhöhte BDNF-Spiegel, was darauf schließen lässt, dass BDNF in der peripheren Nozizeption eine Rolle spielt [32,33]. Durch seine Aktivität in präsynaptischen Arealen erhöht es die Exzitabilität von Neuronen der Substantia nigra und trägt damit zur spinalen Sensibilisierung bei der entzündlich bedingten Hyperalgesie bei [34]. Das primäre afferente Neuron wurde als eine der Hauptquellen für BDNF vorgeschlagen. Hier fungiert BDNF wahrscheinlich als Messenger [25].

### 1.2.1.3 NT-3 (*Neurotrophin-3*) und NT-4/5 (*Neurotrophin-4/5*)

NT-3 und NT-4/5 wurden in den 1990er Jahren entdeckt und werden ebenfalls der Superfamilie der Neurotrophine zugerechnet. So wie ihre Verwandten NGF und BDNF spielen auch sie eine Rolle im Nervensystem, vor allem in der Entwicklung und dem Überleben von Motoneuronen und damit für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Skelettmuskels [35,36]. NT-4 wurde zuerst in peripheren Neuronen des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) entdeckt. Es fördert das Überleben von Neuronen bei Hühnern, während NT-5, das für das Äquivalent beim Säugetier gehalten wurde, dies nicht tut. Ob NT-4 und NT-5 verschiedene Proteine innerhalb der Neurotrophine oder ein und dasselbe Protein verschiedener Spezies sind, ist bislang unklar [37]. NT-3 sorgt auch für das Überleben von Neuronen und Gliazellen im Rückenmark und in Ganglien des Hinterhorns [38]. BDNF, NT-3 und NT-4/5 erleichtern die glutamerge Neurotransmission im Hippocampus von Säugetieren [39].

### 1.2.2 Die Neurotrophin-Rezeptoren

Unter den Rezeptoren, die Neurotrophine binden, gibt es die hochaffinen spezifischen Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC (*tropomyosin related kinase*), die über Tyrosinkinaseaktivität verfügen und jeweils eine starke Präferenz für die einzelnen Neurotrophine zeigen sowie den niedrigaffinen Rezeptor p75, der alle Neurotrophine mit niedriger Affinität bindet. TrkA, TrkB und TrkC verdanken ihren Namen einem Onkogen, das aus einem Kolonkarzinom isoliert wurde und eine bislang unbekannte Tyrosinkinase mit gebundem Tropomyosin kodierte. So wie die Neurotrophine weisen sie

eine hohe Homologie untereinander auf. Im Gegensatz zu p75 weisen sie enzymatische Aktivität auf.

Durch diese Entdeckungen konnten die Signaltransduktionswege, durch die die Neurotrophine ihre Wirkungen vermitteln, untersucht werden. Von allen Rezeptoren existieren *"truncated"* Isoformen, das heißt Rezeptoren, die nicht die volle Länge besitzen. Bei Koexprimierung mit den *„full length“* Rezeptoren üben sie wahrscheinlich durch die Formation nichtproduktiver Heterodimere eine inhibierende Wirkung aus. Alle Rezeptoren werden sowohl in präsynaptischen Axonterminalen als auch in postsynaptischen Dendriten exprimiert [40].

### *1.2.2.1 Der TrkA-Rezeptor*

TrkA, der eine hohe Bindungsaffinität zu NGF hat, ist ebenso wie NGF auf Chromosom 1 lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 140 kDa. Er verfügt über intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität [41]. Er wurde zuerst im Zusammenhang mit einem Onkogen in Kolonkarzinomen entdeckt, in dem man eine neue an Tropomyosin gebundene Tyrosinkinasedomäne entdeckte. Erst später wurde er als Neurotrophin-Rezeptor identifiziert [42]. Die Aktivierung von TrkA durch NGF bewirkt eine Proliferation, Differenzierung und ein Überleben der Zellen. Die Apoptose wird verhindert, die neuronale Erregbarkeit gesteigert und die Freisetzung von Mediatoren aus Zellen, die TrkA exprimieren, gefördert [43]. Trk A wird beim Menschen sowohl von Neuronen des peripheren als auch des Zentralnervensystems exprimiert [44]. Der Bindung von NGF an TrkA wird folgt eine rezeptorvermittelte Endozytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes welcher in Vesikeln ins Zentrum der Neuronen geschleust wird. Auf diese Weise kann NGF als *„second messenger“* Signale an den Zellkern vermitteln und damit transkriptionelle Mechanismen in Gang setzen [45]. Ob diese Vorgänge in Zellen wie Immunzellen oder Gewebszellen genauso ablaufen, ist bislang unbekannt.

### 1.2.2.2 Der TrkB Rezeptor

Bei TrkB handelt es sich um den hochaffinen Rezeptor für BDNF und NT-4/5. Sein Molekulargewicht beträgt 145 kDa [46]. Sowohl bei der Entwicklung und Funktion von peripheren Nerven als auch des Säugetiergehirns spielt er eine wichtige Rolle. Wie TrkA besitzt er ebenfalls Tyrosinkinase-Aktivität. Die Bindung an diesen Rezeptor führt zu oben genanntem Ablauf mit anschließendem Influx von Calcium. Es sind außerdem zwei „*truncated*“ Isoformen dieses Rezeptors bekannt, die über einen noch unbekanntem Mechanismus aktiviert werden. Sie besitzen keine Tyrosinkinase-Aktivität. Durch Splicing können verschiedene Isoformen von TrkB entstehen. Beispielsweise ist eine Isoform von TrkB, der ein spezifischer Rezeptoranteil fehlt, nur in der Lage, BDNF zu binden, während eine andere Isoform, die über diesen Anteil verfügt, zusätzlich NT-3 und NT-4 binden kann. Bei proliferierenden sich differenzierenden Zellen korreliert die Expression von TrkB mit der Beeinflussbarkeit von BDNF. TrkB wird sowohl auf der Zelloberfläche exprimiert als auch in intra-zellulären Vesikeln gespeichert [40]. Nach Wiedemann et al. kommt TrkB auch in Mitochondrien vor, wo es möglicherweise als Signalmolekül fungiert [40,47].

### 1.2.2.3 Der TrkC-Rezeptor

Der TrkC-Rezeptor bindet mit hoher Affinität NT-3. Er besitzt ein Molekulargewicht von 145 kDa und wurde erstmals 1991 von Lamballe beschrieben. Wie bei TrkB sind neben der „*full length*“ Form auch für diesen Rezeptor „*truncated*“ Isoformen bekannt [48]. NT-3 entfaltet über TrkC neuroprotektive sowie neuroregenerative Eigenschaften. So fördert NT-3 über TrkC die Heilung von Verletzungen des Rückenmarks [49] und Knockout-Mäuse für NT-3 oder TrkC zeigen eine Degeneration von Oligodendrozyten im Zentralnervensystem, einen Verlust sensorischer Nervenfasern sowie Defekte in der kardialen Innervation [50]. Insbesondere bei der Propriozeption ist TrkC von größerer Bedeutung. Propriozeptive sensorische Neuronen exprimieren TrkC und reagieren auf NT-3. Ihre Axone sind dicker als die der nozizeptiven TrkA und NGF exprimierenden Neurone [40].



### 1.2.2.4 Der p75<sup>NTR</sup> Rezeptor

Der p75<sup>NTR</sup> Rezeptor ist ein 75-kDa schweres Glykoprotein, dessen kodierendes Gen auf Chromosom 17 lokalisiert ist [51]. Er zeigt eine starke Homologie zu TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), und verfügt wie dieser über eine „*death domain*“, durch die apoptotische Signale an den Zellkern vermittelt werden können. p75 bindet alle Neurotrophine und Proneurotrophine, vor allem NGF und Pro-NGF. Sein extrazellulärer Anteil besteht aus einem asymmetrischen Komplex, der vier cysteinreiche Domänen beinhaltet, weshalb er nur ein Neurotrophinmolekül auf einmal binden kann. Dadurch ist seine Bindung zu den Neurotrophinen wesentlich schwächer als die der Trk-Rezeptoren. In Abwesenheit der Trk-Rezeptoren kann er alle ihre Funktionen übernehmen. Wenn p75 koexprimiert wird, modifiziert er deren Antwort. Vor allem die Affinität von NGF zu TrkA wird gesteigert, während die Bindung von NT-3 zu TrkA verhindert wird. Diese Erkenntnisse sind von großer Bedeutung für die Reifung sympathischer Neuronen. Hier verhindert p75 das axonale Wachstum, das vor allem von NT-3 gesteuert wird, während eine von NGF abhängige Differenzierung und das Überleben durch TrkA gefördert wird. Mit TrkB verhält es sich ähnlich. Seine Affinität zu BDNF wird gesteigert, während die zu NT-3 und NT-4 abgeschwächt wird. Die Koexpression von p75 steigert also die Affinität der hochaffinen spezifischen Neurotrophin-Rezeptoren an ihren jeweiligen primären Liganden. Bei alleiniger Expression von p75 kann es mit oder ohne Ligandenbindung zur Induktion eines programmierten Zelltodes kommen [52].

### 1.2.2.5 Aufbau der Rezeptoren

Die Trk-Rezeptoren besitzen sowohl eine extrazelluläre als auch eine intrazelluläre Domäne. Der extrazelluläre Teil besteht aus von Cysteingruppen umgebenen leucinhaltenen Anteilen und zwei immunglobulinartigen nahe der Zellmembran gelegenen Bereichen. Dieser Anteil stellt die hochaffine Bindungsstelle für das jeweilige Neurotrophin dar. Die Tyrosinkinasedomäne, der diese Rezeptoren ihren Namen verdanken, stellt den intrazellulären Anteil des Rezeptors dar. Die intrazelluläre Domäne ist

sehr viel kleiner als die anderer Tyrosinkinase. Sie enthält lediglich 70 Aminosäuren vor und 15 Aminosäuren nach der Tyrosinkinasedomäne. Ebenfalls wie ihre Liganden weisen die Trk-Rezeptoren eine hohe Homologie (bis zu 50%) untereinander auf. Dies trifft vor allem auf ihre extrazellulären Anteile zu. Eine Änderung der Aminosäuresequenz der Neurotrophin bindenden Domäne kann die Antwort der Rezeptoren auf ihre Liganden modifizieren. Das scheint daran zu liegen, dass von allen Trk-Rezeptoren Splice-Varianten vorhanden sind, die durch Mutationen entstehen. [53,54]

### 1.2.2.6 Signaltransduktionswege

Anfangs ging man davon aus, dass alle Neurotrophin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Bei Zellkulturversuchen mit ZNS-Neuronen stellte sich jedoch heraus, dass die Trk-Rezeptoren in Abwesenheit von Signalen in intrazellulären Vesikeln gespeichert werden. Durch Stimuli wie elektrische Aktivität, cAMP und  $Ca^{2+}$  werden die Rezeptoren an die Zelloberfläche befördert. Die Bindung des Liganden an den entsprechenden Trk-Rezeptor führt zu einer Homodimerisation und Aktivierung der Tyrosinkinase durch Phosphorylierung. Intermediäre Proteine wie Shc und Grb2 rekrutieren den Guanin-Nukleotid-Exchange-Factor Sos zur zytoplasmatischen Membran. Daraufhin kommt es zu einer Bindung von GTP an Ras. Dadurch werden verschiedene Downstream-Kaskaden in Gang gesetzt, darunter Raf/MEK/ERK und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-AKT1 pathway, der in neuronalen Zellen Wachstum und Überleben reguliert. Die Phosphorylierung von Erk führt indirekt zur Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren beispielsweise durch CREB (*cAMP response element binding protein*). Durch PLC- $\gamma$  (Phospholipase C- $\gamma$ ), die ebenfalls von Shc und Grb2 aktiviert wird, kommt es zu einem Influx von Calcium [55]. Alle diese Wege führen letzten Endes zu transkriptionellen Veränderungen. Diese höchst komplexen Signaltransduktionswege sind vor allem durch Untersuchungen am Nervengewebe beschrieben worden. Über nichtneuronale Zellen ist in diesem Zusammenhang noch wenig bekannt. Durch Entstehung von Splice-Varianten, Koexpression von p75 und anderen noch unbekannte Mechanismen agieren die Rezeptoren miteinander und somit ist es sehr wahrscheinlich, dass

auch ihre Signaltransduktionswege miteinander interagieren. Wie das geschieht, bleibt bislang Gegenstand weiterer Untersuchungen.

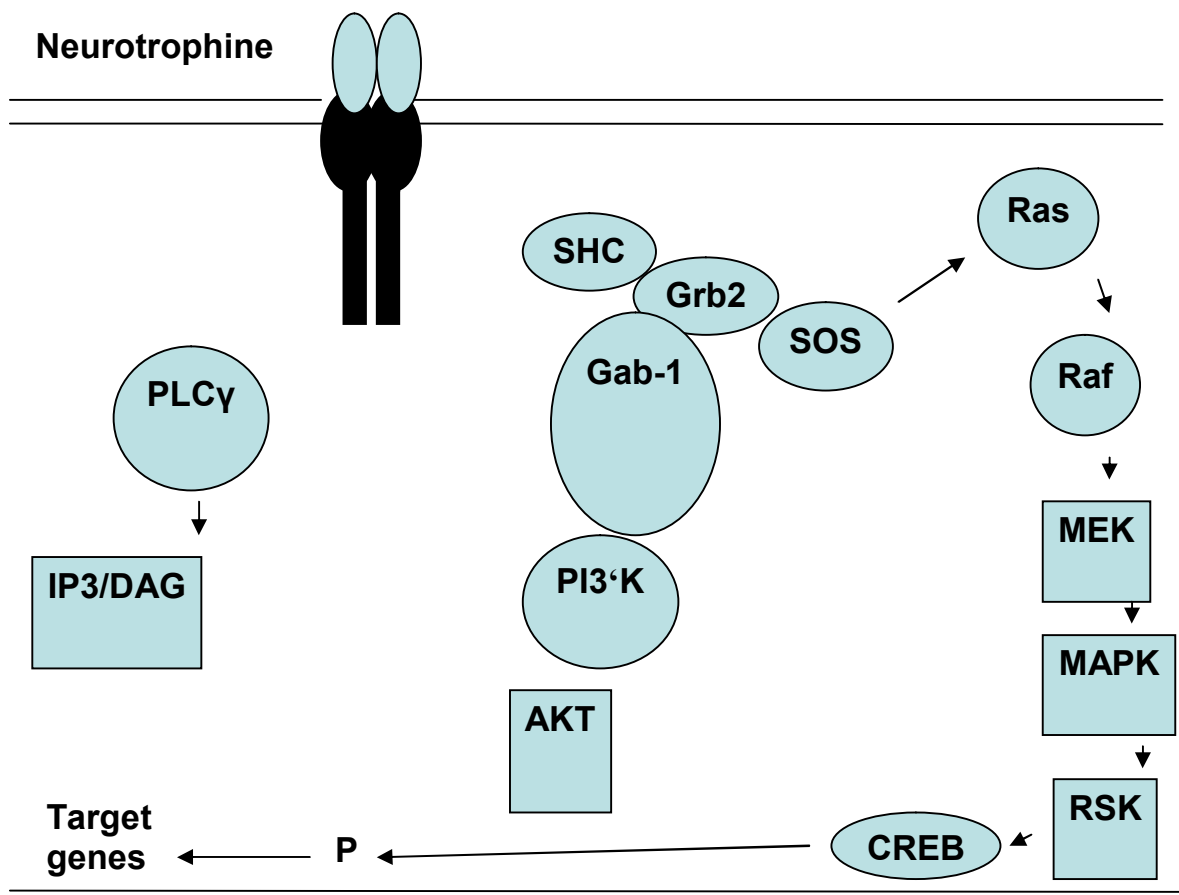


Abb.2: Die Bindung der Neurotrophine an ihre Rezeptoren setzt verschiedene Signaltransduktionsmechanismen in Gang

### 1.2.2.7 Interaktion der Rezeptoren und Internalisierung

Die Aktivierung der Rezeptoren läuft nicht getrennt voneinander ab. Vielmehr existieren viele noch nicht vollständig geklärte Interaktionen der hochaffinen spezifischen Trk-Rezeptoren sowie des niedrigaffinen Rezeptors p75. Nach langwierigen biochemischen Untersuchungen kam man zu dem Schluss, dass es drei verschiedene Formen der Rezeptorkomplexe gibt. Homodimere Trk-Rezeptor-Komplexe, homodimere p75-Rezeptor-Komplexe und dimere Komplexe, die sowohl Trk als auch p75 enthalten. Wie oben beschrieben, kommt p75 dabei vor allem die Rolle zu, die Spezifität und Affinität des jeweiligen Tyrosinkinase-Rezeptors zu steigern. Durch einen Clathrin-abhängigen Mechanismus können Trk-Rezeptoren in intrazelluläre Vesikel geschleust werden. Ausgehend von diesem intrazellulären Speicher können sie verschiedene Wege einschlagen: Entweder werden sie wieder zur Zelloberfläche transportiert, wo sie den entsprechenden Liganden binden können, werden in Proteasomen verdaut oder sie werden durch retrograden Transport durch das Neuron in das Zellsoma transferiert. Letztere werden vor allem in der Signaltransduktion bei embryonalen Neuronen benötigt [56].

### 1.2.3 Rolle der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren im Immunsystem

Circa vier Jahrzehnte nach der Entdeckung von NGF wurden neurotrophe Faktoren auch auf Zellen des Immunsystems und Gewebszellen nachgewiesen sowie deren Wirkungen auf die Zellen beschrieben.

So wurden im Thymus von Wirbeltieren Neurotrophine und ihre Rezeptoren gefunden und Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Neurotrophine und ihre Rezeptoren (Trk und p75) zur T-Zelldifferenzierung beitragen [57]. NGF und TrkA wird nach Untersuchungen von Ehrhard et al. vor allem von TH2-Zellen exprimiert [58]. NGF scheint durch TrkA die B-Zell-Differenzierung zu regulieren [59]. D'Onofrio et al. fanden alle Trk-Rezeptoren auf B-Lymphozyten [60]. Auch basophile Granulozyten und Monozyten sowie Fibroblasten wird exprimieren TrkA [61-64]. Mittels Immunhistochemie wurden TrkB und TrkC in ihrer „truncated“ Form in Makrophagen und TrkA in den Kapillarzellen in der Lunge von Mäusen gefunden [65]. Auf Mastzellen

wurde TrkA, TrkB und TrkC nachgewiesen [58]. NGF wurde aus glatten Muskelzellen des Respirationstrakts isoliert [66]. Auch Fibroblasten exprimieren NGF [67]. NGF wird unter inflammatorischen Bedingungen von Mastzellen sowie Keratinozyten [68] produziert und ist in der Lage, Mastzellen zu beeinflussen. Darüber hinaus scheint NGF am Überleben, der Differenzierung und der Funktion von Mastzellen beteiligt zu sein [69-71]. Makrophagen [63] und eosinophile Granulozyten [72] sind ebenfalls in der Lage, NGF zu synthetisieren.

Unstimulierte Monozyten sezernieren BDNF. Durch Stimulation mit IL-6 und TNF- $\alpha$  kann die Produktion hochreguliert werden [73]. Auch in Überständen stimulierter B- und T-Zellen wurde BDNF nachgewiesen [74]. Thrombozyten fungieren als Speicherrort für BDNF [75]. Auch NT-3 und NT-4/5 sind nicht nur dem Nervensystem vorenthalten. So sind eosinophile Granulozyten unter anderem eine Quelle für NT-3 [72]. Jedoch sind die Kenntnisse über die Neurotrophine und ihre Aktivierung vor allem im Zusammenhang mit dem Immunsystem nach wie vor lückenhaft und das Thema bedarf weiterer Forschung.

### 1.2.4 Erkrankungen mit veränderter Neurotrophin-Expression

Veränderte Neurotrophin-Spiegel sind mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen assoziiert. Bei Patienten mit Chronischer Polyarthritits fand man erhöhte NGF-Spiegel in der Synovialflüssigkeit [76]. Im Serum von Patienten mit SLE (Systemischer Lupus Erythematoses) fand man ebenfalls eine Erhöhung der basalen NGF-Spiegel [77]. Bei Sklerodermie wurde mittels Immunhistochemie in der Haut NGF erhöht nachgewiesen [78]. Im Liquor an Multipler Sklerose leidender Patienten konnten ebenfalls signifikant erhöhte NGF- und BDNF-Spiegel nachgewiesen werden und bei disseminierter Enzephalitis ein erhöhtes BDNF [74,79,80].

Nicht nur in Autoimmunerkrankungen, sondern auch bei Infektionen wurden erhöhte Neurotrophin-Spiegel nachgewiesen. Bei parasitären Erkrankungen wie Schistosomiasis konnten erhöhte Neurotrophin-Spiegel nachgewiesen werden [81,82]. Bei RSV-Infektionen kommt es ebenfalls zu einer gesteigerten Synthese von Neurotrophinen [83].

Auch psychiatrische Erkrankungen gehen mit einer veränderten Neurotrophin-Expression einher. Bei der MDD (*major depressive disorder*) liegt das Serum-BDNF signifikant erniedrigt vor [84]. Bei Patienten, die eine Therapie mit Antidepressiva erhalten hatten, fanden sich höhere BDNF-Spiegel im Gegensatz zu Patienten, die keine antidepressiven Medikamente erhielten [85]. Bei Ratten führte eine Elektrokrampftherapie zu einer Hochregulierung der mRNA von BDNF im Hippokampus [86]. Bei Frauen, die an den Essstörungen Anorexia und Bulimia nervosa litten, fand man signifikant erniedrigte BDNF-Spiegel im Serum [87]. Mutationen von TrkA und die damit verbundene Störung der Signalvermittlung durch NGF sind nach neueren Erkenntnissen Verursacher der hereditären sensorischen und autonomen Neuropathie Typ IV, auch bekannt als CIPA (*congenital insensitivity to pain and anhidrosis*) [88].

### 1.2.5 Expression von Neurotrophinen in der Lunge

Hikawa et al. untersuchten Mäuselungen auf ihre Neurotrophin-Expression und fanden NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 sowie die hochaffinen Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC in alveolären und interstitiellen Makrophagen, Kapillarzellen und alveolären Epithelzellen [65]. In einer anderen Studie exprimierten humane alveoläre Makrophagen kaum NGF, während BDNF und NT-3 gar nicht nachweisbar waren. Die Trk-Rezeptoren wurden jedoch alle nachgewiesen, vor allem TrkB, den 10% der untersuchten Makrophagen exprimierten [89].

### 1.2.6 Rolle der Neurotrophine bei allergischen Erkrankungen - bisherige Erkenntnisse

Neuere Studien ergaben, dass NGF nicht nur ein entscheidender Wachstums- und Überlebensfaktor von Neuronen ist, sondern auch ein wichtiger inflammatorischer Mediator. Bei allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale fanden sich erhöhte NGF-Werte im Serum und bei BAL-Untersuchungen (bronchoalveoläre Lavage) war die NGF-Produktion nach segmentaler Allergenprovokation deutlich erhöht [90,91]. NGF erhöht wie ein Zytokin unter anderem die Bildung von IL-4 und IL-5, was dann

zu einer erhöhten eosinophilen Infiltration und Aktivierung von Mastzellen führt [92,93]. In den oberen Atemwegen konnten in durch nasale Lavage gewonnener Flüssigkeit bei Allergikern eine lokale Erhöhung von NGF nachgewiesen werden. Eine nasale Allergenprovokation führte zu einer zusätzlichen Erhöhung der NGF-Spiegel [94]. Beim allergischen Kontaktekzem konnte mittels Immunhistochemie eine erhöhte Expression von NGF in Hautbiopsien nachgewiesen werden. NGF könnte hier durch Beeinflussung von unter anderem Langerhanszellen und Mastzellen einen Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung nehmen [95]. Die Inhalation geringer Antigen-Dosen führt bei Patienten mit leichtem Asthma bronchiale zu einem lokalen Anstieg von Mastzellen sowie NGF und TrkA [96].

Auch BDNF wird vermehrt bei entzündlichen Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale oder entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems wie Multiple Sklerose ausgeschüttet. Die BDNF-Werte steigen vor allem in der Spätphase-Reaktion nach segmentaler Allergenprovokation [97]. Bei Patienten, die an allergischem Asthma bronchiale litten, wurden sowohl im Serum als auch in den Thrombozyten signifikant erhöhte BDNF-Konzentrationen gemessen. Durch Gabe von Kortikosteroiden konnte die Produktion von BDNF supprimiert werden [75]. In der BAL wurde bei Entzündungen der Atemwege erhöhte BDNF-Spiegel gemessen. In einem Asthma-Mausmodell sind Makrophagen als hauptsächliche Quelle der Produktion von BDNF im entzündeten Lungengewebe beschrieben worden. Diese BDNF-Produktion wurde vor allem durch Allergenprovokation hervorgerufen, da die Makrophagen der Kontrolltiere keine Ausschüttung von BDNF zeigten [98]. Aus Monozyten generierte Makrophagen schütten vermehrt BDNF aus, wenn sie mit TNF- $\alpha$  und Il-6 stimuliert werden [73]. Auch bei atopischer Dermatitis konnten erhöhte BDNF-Spiegel im Serum, im Plasma, in Eosinophilen und in Überständen kultivierten Eosinophilen gemessen werden [99]. Eosinophile Granulozyten von Allergikern produzieren und speichern deutlich mehr NGF und BDNF als die von Nichtallergikern. Bei Allergikern führte eine Behandlung der Eosinophilen mit Theophyllin und Dexamethason zu einem deutlichen Abfall von NGF [100]. NGF, BDNF sowie NT-3 werden von Eosinophilen produziert, gespeichert sowie sezerniert, wobei sich in den Ly-saten aus Eosinophilen von Allergikern erhöhte Neurotrophin-Mengen fanden. So

kommen auch die Eosinophilen Granulozyten als Mitverursacher für die bei Allergikern erhöhten Neurotrophin-Spiegel in Frage [72].

Für die Wirkungsweise, wie die Neurotrophine das allergische Asthma mit bedingen, stehen folgende Mechanismen zur Diskussion: Durch Beeinflussung der Innervation der Lunge können sie die bronchiale Hyperreagibilität mit verursachen. Zweitens können sie direkt die glatte Muskulatur der Bronchien beeinflussen. Drittens bewirken sie durch zytokinähnliche Eigenschaften zum einen eine Einwanderung von Entzündungszellen, zum anderen beeinflussen sie die Produktion anderer an der allergischen Entzündung beteiligter Zytokine [92].

### 1.2.7 Das Prinzip der neurogenen Entzündung beim allergischen Asthma bronchiale – Rolle der Neurotrophine

Bei der Pathogenese des allergischen Asthmas besteht ein intensiver Kontakt zwischen Nervenzellen und Zellen des Immunsystems. Beide sind in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen und ihre jeweiligen Wirkungen zu potenzieren. Auf diese Weise wurde der Begriff der neurogenen Entzündung geprägt [101]. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass bei der Entwicklung der Hyperreagibilität im Rahmen chronischer Entzündungen der Atemwege nervale Prozesse beteiligt sind. Es sind sowohl sympathische als auch parasympathische Nervenfasern an der Konstriktion und Dilatation der Bronchien beteiligt. Auch Nervenfasern des NANC-Nervensystems (*non adrenergic-non cholinergic*) sind in letzter Zeit in den Focus des Interesses gerückt. Sie scheinen ebenfalls eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Lungenerkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale zu spielen [102]. Die drei Systeme sind nicht strikt voneinander getrennt, sondern beeinflussen sich gegenseitig. Sie regulieren sowohl physiologische Vorgänge in den Atemwegen als auch krankhafte Veränderungen. So sind sie unter anderem zuständig für den Tonus der glatten Muskelzellen, die Schleimproduktion, die mikrovaskuläre Permeabilität und die Einwanderung von Entzündungszellen [101]. Neuropeptide wie insbesondere Substanz P und Neurokinin A, die der Superfamilie der Tachykinine zugeordnet werden, sind bei allergischen Atemwegserkrankungen erhöht nachgewiesen worden. Sie werden sowohl von Nervenzellen als auch von Zellen des Immunsys-



tems exprimiert und sind mit hoher Wahrscheinlichkeit mitverantwortlich für die entzündlichen Begleiterscheinungen wie Bronchiokonstriktion, Hyperperreagibilität und Gefäßdilatation [9,103]. Außerdem sind sie in der Lage, die Histaminfreisetzung von Mastzellen der Lunge zu stimulieren [104]. Auch bei Hautkrankheiten wie Psoriasis und Neurodermitis gibt es eine neurogene Komponente. Nervenfasern der Haut setzen verschiedene Neurotransmitter frei, die Rezeptoren auf zahlreichen Hautzellen aktivieren, darunter zum Beispiel Langerhanszellen, Keratinozyten, Mastzellen und Fibroblasten [105].

Die Mechanismen der Interaktion zwischen Nerven- und Immunsystem sind noch weitgehend unbekannt. Die Neurotrophine spielen hier möglicherweise eine Rolle, da sie maßgeblich an der Neuropeptid-Synthese beteiligt sind [106]. NGF induziert vor allem bei sensorischen Nervenfasern und ihren Axonen, die das entzündete Gewebe innervieren, eine stark erhöhte Bildung von Substanz P und CGRP (*calcitonin gene related peptide*) [107]. Die Bildung von Substanz P wird durch die Gabe von Anti-NGF gehemmt [108]. Die Neurotrophine werden sowohl von Lungengewebszellen als auch von zirkulierenden Immunzellen, die unter pathologischen Bedingungen ins Lungengewebe einwandern, exprimiert [109]. Transgene Mäuse weisen durch eine Überexpression von NGF eine Hyperinnervation der Lunge auf. Sie reagieren auf Inhalation mit Capsaicin, ein Stoff, der die Freisetzung von Neuropeptiden aus dem Nervengewebe fördert, mit bronchialer Obstruktion. Ihr Lungennervengewebe enthält vermehrt sympathische und tachykininhaltige Nervenfasern [110]. NGF erhöht dabei zusätzlich die bronchiale Empfindlichkeit auf Histamin [111]. Außerdem bewirkt NGF, dass sich im pulmonalen Nervensystem sensorische C-Fasern einlagern [108]. Schmerz und Hyperalgesie sind wichtige Faktoren bei Entzündungen. Bei Entzündungen wird die Schwelle, ab der man Schmerz empfindet, durch verschiedene Entzündungsmediatoren herabgesetzt. NGF ist an der inflammatorischen Hypersensibilität [112] sowie der zentralen Sensibilisierung [113] bei entzündlichen Vorgängen beteiligt.

## **1.3 Die Dendritischen Zellen**

### 1.3.1 Geschichte

Die Dendritischen Zellen wurden erstmals 1868 durch den deutschen Anatom Paul Langerhans beschrieben, der sie in den basalen Schichten der Epidermis entdeckte. Ihren Namen verdanken sie ihrer Fähigkeit, sogenannte Dendriten auszubilden, lange Ausläufer, die mit den Epithelzellen verflochten sind („dendros“ = Baum, gr.). Diese charakteristische Form veranlasste Paul Langerhans zu glauben, bei diesen Zellen handle es sich um Neuronen. Erst in den 1970er Jahren entdeckte die Arbeitsgruppe um Steinmann, dass es sich bei diesen Zellen um weiße mit den Makrophagen verwandte Blutzellen handelt. Daraufhin wurden die Dendritischen Zellen in allen Lymphorganen, im Blut, im Knochenmark und in verschiedenen anderen Organen einschließlich Lunge, Intestinaltrakt, Leber, Herz, Niere und Urogenitaltrakt beschrieben [114-116]. Sie befinden sich also in fast jeder Gewebeart. Im Blut vorkommende Dendritische Zellen stellen nur ca. 0,1-0,9% der Leukozyten dar [117]. Die in der Haut vorkommenden Dendritischen Zellen werden bis heute nach ihrem ursprünglichen Entdecker als „Langerhanszellen“ bezeichnet [118].

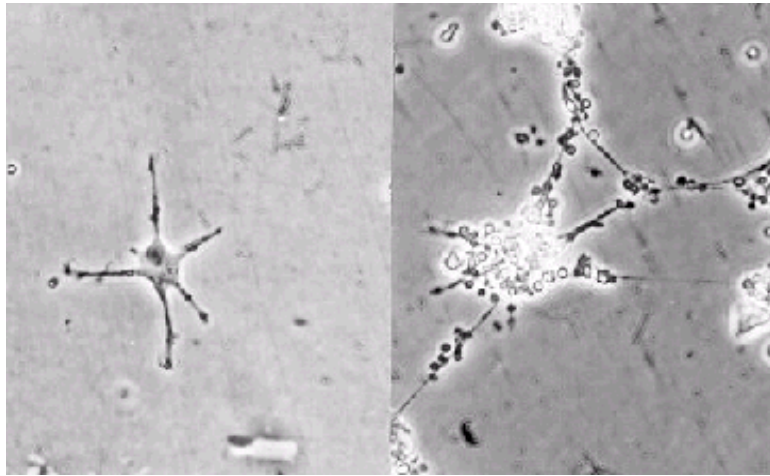


Abb.3 unreife Dendritische Zelle      reife Dendritische Zelle  
Quelle: [www.geocities.com](http://www.geocities.com)

### 1.3.2 Morphologie, Herkunft und Eigenschaften

#### 1.3.2.1 Funktion

Dendritische Zellen (DC) sind Zellen des angeborenen Immunsystems und gehören zu den Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Sie benötigen keinen spezifischen Stimulus, um aktiviert zu werden, sondern können aufgrund einer Vielzahl verschiedener Oberflächenrezeptoren nahezu jedes Fremdartigen erkennen, phagozytieren und so prozessieren, dass T- oder B-Zellen dieses erkennen und spezifisch darauf reagieren können. Unreife DCs sind in der Lage, sich durch Chemotaxis fortzubewegen, das heißt sie werden durch chemotaktische Stoffe und proinflammatorische Zytokine, die von Epithel- und Endothelzellen sowie Leukozyten gebildet werden, an einen Ort des Körpers rekrutiert, in dem eine Entzündung stattfindet. In dieser Phase können die DCs Antigene aufnehmen, in Fragmente zerlegen und prozessieren, sind aber kaum in der Lage, T-Zellen zu stimulieren. Dazu müssen „Gefahrensignale“ hinzukommen, molekulare Signale, die durch Pathogene oder Gewebszerstörung hervorgerufen werden. Das entsprechende Antigen wird durch einen Rezeptor der TLR-

Familie (*toll like receptor*) erkannt und internalisiert. Daher handelt es sich bei der Phagozytose um eine rezeptorvermittelte Endozytose, die Aktin- und ATP-abhängig ist. Bestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien wie LPS oder grampositiver Bakterien wie die Lipoteichonsäure, CpG Oligonukleotide oder virale DNA führen zur funktionellen Reifung der Dendritischen Zellen, welche mit der Ausbildung langer Dendriten einhergeht [119]. Auch endogene Signale können zu einer Reifung und Migration der DCs führen. So können zum Beispiel Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 oder Hitzeschockproteine aus nekrotischen Zellen eine Aktivierung der DCs bewirken [120]. Um das Antigen auf der Zelloberfläche präsentieren zu können, wird der ins Phagosom internalisierte Mikroorganismus proteolytisch prozessiert. Bei diesem Vorgang büßen die DCs ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und –prozessierung ein. Dafür werden nun Antigenfragmente zusammen mit MHC II-Molekülen (*major histocompatibility complex*) und einer Reihe kostimulatorischer Faktoren für die T-Zellen auf der Zelloberfläche präsentiert. Gleichzeitig werden die DCs durch Chemokine zu T-Zell-reichen Arealen der Lymphorgane rekrutiert. Nach ihrer Wanderung in den Lymphknoten induzieren die DCs eine Proliferation antigenspezifischer T-Zellen, die die Zytokine produzieren und in befallenes Gewebe wandern können [121]. Bei diesem äußerst wirksamen und komplexen Abwehrsystem besteht immer die Gefahr, dass DCs körpereigene oder normalerweise nicht pathogene Antigene internalisieren und präsentieren, was zu Autoimmunität und Allergie führen kann.

### *1.3.2.2 Herkunft und Einteilung*

Bei den Dendritischen Zellen handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die, je nach Lokalisation und Reifegrad unterschiedliche Funktionen ausüben. Sie entstammen der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark und können sich in verschiedene Subtypen differenzieren.

Aus verschiedenen Studien haben sich drei verschiedene Untergruppen der Dendritischen Zellen hervorgetan, die sich durch verschiedene, teilweise noch unbekannte Mechanismen differenzieren:

- plasmazytoide DCs, die aus einer lymphoiden CD34<sup>+</sup>Vorläuferzelle hervorgegangen sind [122]
- interstitielle DCs, deren Ursprung in einer myeloischen CD34<sup>+</sup>Vorläuferzelle liegt und die im Blut als CD14<sup>+</sup>Monozyten zirkulieren [123]
- epidermale Langerhanszellen [124]

Die Dendritischen Zellen existieren in verschiedenen Funktions- und Reifegraden. Dies erklärt unter anderem ihre Vielfalt an Oberflächenmolekülen und Möglichkeiten, mit anderen Zellen zu interagieren [122].

Entsprechend der Entwicklung Dendritischer Zellen gibt es drei Differenzierungsstadien:

- Progenitorzellen, die in Blut und Lymphe zirkulieren
- Unreife DCs
- Reife DCs, die in den Lymphknoten lokalisiert sind und T-Zellen stimulieren

Die unreifen DCs verteilen sich weitläufig in den Kompartimenten des Körpers, sowohl in Lymphorgane als auch in anderes Gewebe. Sie besitzen die Fähigkeit, Fremdantigene zu internalisieren, was dann zu ihrer funktionellen Reifung und Ausbildung von kostimulatorischen Molekülen wie MHC II führt, durch die sie eine T-Zell-Antwort induzieren können [125]. Nach ihrer Aktivierung durch ein Antigen wandern sie in die Lymphknoten, in denen sie verweilen, um naive T-Zellen zu stimulieren [126]. Beim Menschen befinden sich besonders die plasmazytoiden Zellen gehäuft in T-Zell-reichen Arealen des lymphatischen Gewebes. Die Stimuli, die die Migration der Dendritischen Zellen induzieren, umfassen Pathogene wie beispielsweise Erregerbestandteile, inflammatorische Chemokine, IL-1 und TNF- $\alpha$ .

Die Reifung der unreifen DCs kann in der Zellkultur durch Stimulation mit LPS, TNF- $\alpha$  oder CD40L erreicht werden. Diese geht mit einer initial erhöhten IL-12-Produktion einher, im Laufe ihrer Reifung wird es herunterreguliert und andere Zytokine treten in den Vordergrund. Sobald sie das Reifestadium erreicht haben, verlieren sie die Fähigkeit zur Phagozytose und interagieren stattdessen mit T-Zellen. Dies unterstützt die Annahme, dass Dendritische Zellen unterschiedlichen Reifegrades auch unterschiedliche Aufgabenbereiche haben.

### *1.3.2.3 T-Zell-Aktivierung*

Dendritische Zellen können bei CD4<sup>+</sup>Zellen eine TH1- als auch eine TH2-Antwort, bzw. eine zelluläre oder humorale Antwort, induzieren. Diese vereinfachte Einteilung der T-Helfer-Zellen hat sich als nützlich im Hinblick auf das Verständnis der Physiologie und Pathologie des Immunsystems erwiesen [127]. Im Gegensatz zur CD8<sup>+</sup>Zelle (zytotoxische T-Zelle), als deren Stimulus MHC I agiert, ist bei der CD4<sup>+</sup>-Zelle (T-Helfer-Zelle) MHC II essentiell für deren Aktivierung. Den TH1-Zellen kommt die hauptsächliche Aufgabe zu, intrazelluläre Erreger wie Parasiten, Pilze, Viren oder Mykobakterien zu bekämpfen. Die TH1-Antwort ist unter anderem gekennzeichnet durch die Produktion der Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . TH2-Zellen hingegen sind hauptsächlich bei der Abwehr extrazellulärer Erreger aktiv. Sie regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an. Auch die bei der allergischen Sofortreaktion charakteristisch erhöhte IgE-Produktion wird indirekt durch TH2-Zellen verursacht [128]. Für die TH2-Zell-Differenzierung sind besonders die Zytokine IL-4 und IL-13 bekannt, auch IL-6 steht zur Diskussion. Durch IL-6 könnten andere Zelle dazu angeregt werden, IL-4 zu produzieren, welches dann die Differenzierung von TH2-Zellen induziert. Außerdem wird vermutet, dass sie durch Inhibition der IL-12-Produktion durch Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  indirekt eine TH2-Antwort induzieren könnten [129].

Des Weiteren spielt eine Rolle, wie viel IL-12 gebildet wird, ein Zytokin, das sehr stark TH1-polarisierend wirkt. Wie viel IL-12 gebildet wird, hängt zum einen von der Herkunft der Dendritischen Zelle, zum anderen von den Umweltbedingungen ab. Außerdem spielt der Reifegrad der Dendritischen Zelle eine Rolle. DCs mit niedrigerem Reifegrad scheinen mehr IL-12 zu sezernieren als reifere DCs. Jedoch besitzt jede Untergruppe der Dendritischen Zellen ein gewisses Maß an Flexibilität bei der T-Zell-Aktivierung. Diese hängt nämlich auch noch von der Art und Menge an Pathogenen ab, durch die die Dendritische Zelle aktiviert wird [130]. Bislang bleibt weitgehend unklar, welche Rolle die Dendritische Zelle bei TH2-Zell-Aktivierung spielt, möglicherweise durch Produktion oben genannter Zytokine.

Bei der Aktivierung von T-Zellen spielen außerdem Rezeptoren und Liganden der TNF-Familie wie beispielsweise CD40 und sein Ligand CD40L eine große Rolle. Bei der Interaktion von Dendritischen Zellen mit T-Zellen kommt es zu einer verstärkten Expression von CD40L. Auf T-Zellen wird ICAM-3 (*intracellular adhesion molecule*) hochreguliert, das durch eine Bindung an DC-SIGN (*DC specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*) die Bindung des TCRs (*t cell receptor*) an MHC II unterstützt [131]. Um die für die Proliferation von T-Zellen essentielle Adhäsion der Dendritischen Zelle zur T-Zelle zu ermöglichen, werden LFA-1 (*leukocyte function antigen*) und ICAM-1 exprimiert [132].

### *1.3.2.4 Oberflächenmoleküle von Monozyten und Dendritischen Zellen*

Dendritische Zellen besitzen eine Vielzahl von Oberflächenmolekülen, durch die sie sich teilweise in verschiedene Gruppen einteilen lassen. Zum einen wird die Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen durch den Ursprung der einzelnen Zelle geprägt, zum anderen werden während des Reifungsprozesses viele verschiedene Proteine auf der Zelloberfläche jeweils hoch- oder herunterreguliert. Durch diese Diversität der Oberflächenrezeptoren können die Dendritischen Zellen nahezu jedes Fremdartigen binden. Jedoch ist die Vielzahl der Oberflächenmoleküle, ihre Funktion und Interaktion mit anderen Zellen, darunter vor allem den T-Zellen, immer noch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auch sind die Ergebnisse der bislang existierenden Studien teilweise kontrovers. Dies könnte unter anderem an den unterschiedlichen Methoden liegen, mit denen Dendritische Zellen gewonnen werden.

Monozyten und Dendritische Zellen lassen sich mittels immunologischer Methoden durch die Expression spezifischer Oberflächenmoleküle oder die Abwesenheit von durch T-, B-, NK-Zellen oder Granulozyten exprimierte Marker identifizieren. Aufgrund der Diversität der Reifegrade, Lokalisation und Eigenschaften der DCs ist es nicht möglich, sie anhand eines einzelnen Markers zu identifizieren. Es werden für die jeweilige Subpopulation spezifische Marker verwendet. Da Dendritische Zellen zu einem sehr geringen Prozentsatz im Blut vorhanden sind und es sehr aufwändig ist,

sie aus nativem Gewebe zu isolieren, benutzt man für Experimente meist MoDCs (*monocyte derived dendritic cells*), aus Monozyten generierte Dendritische Zellen.

### 1.3.2.5 Oberflächenmoleküle und Rezeptoren der Dendritischen Zellen

<b>Oberflächenmolekül</b>	<b>Hintergrund/Funktion (soweit bekannt)</b>
<u>TLRs (<i>toll like receptors</i>)</u> [133]	Bindung von PAMPs ( <i>pathogen associated molecular patterns</i> ) (Bestandteile von Bakterien und Pilzen (z.B. Zellwandkomponenten, DNA)
<u>Fc-Rezeptoren</u> [134] (Fcγ-Rezeptoren CD32 und CD64, Fcε-RI und Fcε-RII)	antikörperspezifisch, Vermittlung der Phagozytose  hochaffin niedrigaffin
Mannose/β-Glucan-Rezeptor [135]	Phagozytose nicht opsonisierter nicht-opsonisierter Antigene, Bindung von Mikroorganismen, die auf ihrer Oberfläche mannosylierte Glykoproteine exprimieren
Scavenger-Rezeptor (avβ5 und CD36)	Vermittlung der Phagozytose apoptotischer Zellen
DEC-205R [136]	Antigenprozessierung

### 1.3.2.6 Gruppierungen der Dendritischen Zellen und spezifische Oberflächenmoleküle und Rezeptoren

#### 1. Plasmazytoide DCs

Plasmazytoide Dendritische Zellen haben eine starke Ähnlichkeit zu Plasmazellen. Sie sind in der Lage, große Mengen Interferon-γ zu produzieren und wurden deswegen früher als IPC (*interferon producing cells*) bezeichnet, bis man geklärt hatte, dass es sich hierbei um Vorläufer der Dendritischen Zellen handelte. Abhängig vom Stimulus können ihre Vorläufer, CD4<sup>+</sup>CD11-Zellen, sich auch in T-, B- oder NK-



Zellen differenzieren. Um in vitro zur plasmazytoiden DCs zu differenzieren, ist die Anwesenheit von IL-3 und CD40L notwendig [137]. Deswegen haben die plasmazytoiden DCs mit diesen Zellen mehr Ähnlichkeit als mit den myeloiden Dendritischen Zellen oder den Langerhanszellen. Mit jenen haben sie lediglich eine funktionelle Homologie hinsichtlich der Interaktion mit T-Zellen. Auf virale Infektionen reagieren sie mit einer Ausschüttung von IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , was darauf hindeutet, dass sie bei der Bekämpfung von Viren eine wichtige Rolle spielen [138].

Spezifische Oberflächenmoleküle      Hintergrund/Funktion (soweit bekannt)

- CD123
- TLR7
- TLR9                                      Bindung von bakterieller DNA [139]
- CXCL9                                      Migration zu regionalem Lymphgewebe
- E-Selektin

## 2. Langerhanszellen

Langerhanszellen, aus einer myeloische Vorläuferzelle hervorgegangene DCs, befinden sich zwischen Keratinozyten der Epidermis und exprimieren MHCII auf ihrer Oberfläche. Damit stellen sie ein wichtiges Glied im Immunsystem der Haut dar [140].

Spezifische Oberflächenmoleküle [124]      Hintergrund/Funktion

- |                  |  |
|------------------|--|
| CD1a             |  |
| Birbeck-Granules | endosomale      Recyclingkompartimente, Speicherung von Langerin [141]                       |
| Langerin         |  |
| E-Cadherin       | Zellkontakt mit Keratinozyten [137]  |
| CD11b            | Komplementrezeptor, bindet CD54 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül) und Komplementfaktor iC3b |
| CD11c            | bindet Fibrinogen [142]  |

### 3. Myeloide DCs

Bei im Gewebe vorhandenen myeloiden DCs handelt es sich um interstitielle DCs. In vitro können aus der CD34<sup>+</sup>Vorläuferzelle durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  und GM-CSF Monozyten generiert werden. Die dadurch entstehenden CD14<sup>+</sup>Monozyten können dann durch weitere Stimulation entweder zu Makrophagen oder aber zu unreifen und schließlich reifen DCs differenzieren [143]. In diesem Stadium wird MHC II noch intrazellulär gespeichert, um dann nach der Phagozytose und Migration an der Oberfläche exprimiert zu werden.

<u>spezifische Oberflächenmoleküle</u>	<u>Hintergrund/Funktion</u>
- CD1a	
- CD11b	
- CD9	
- CD68	kostimulatorische Moleküle, wichtig für die
- CD80	Interaktion mit T-Zellen [125]
- CD86	
- Koagulationsfaktor XIIIa	Transglutaminase [124]
- TLR2	Bindung von Lipoproteinen und Glykolipiden
- TLR4	Bindung von LPS
- CCL21	Migration zu regionalem Lymphgewebe [139]

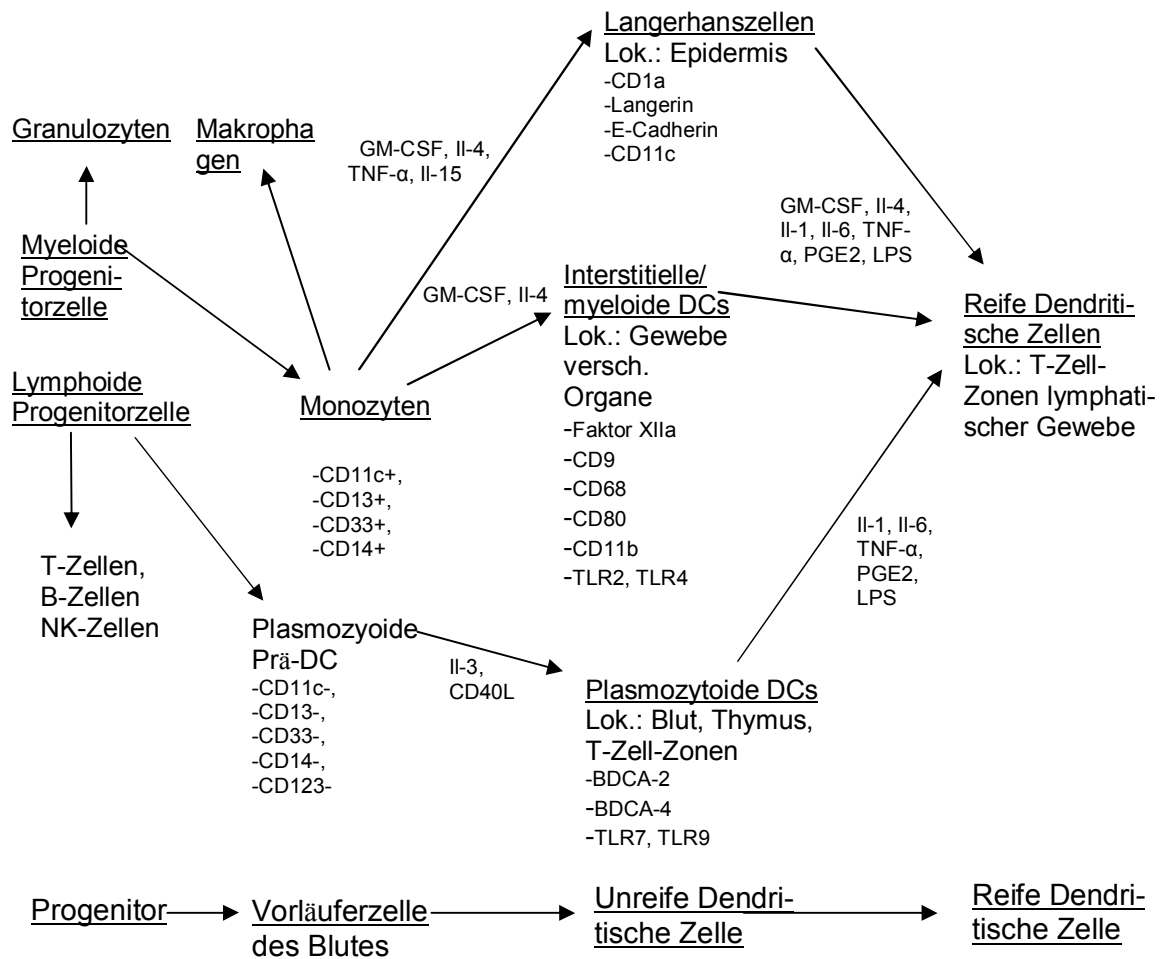


Abb.4: Differenzierungswege der Dendritischen Zellen

#### 4. Monocyte Derived Dendritic Cells – in Zellkultur generierte Dendritische Zellen

Sallusto und Lanzavecchia etablierten anfang der 1990er Jahre ein Verfahren, mit dem man aus Monozyten unreife, zur Phagozytose und Antigenpräsentation befähigte Dendritische Zellen generieren konnte. Dazu werden CD14<sup>+</sup>Monozyten eine Woche lang mit GM-CSF und IL-4 stimuliert. Die so gewonnenen Dendritischen Zellen ähneln am ehesten den oben beschriebenen Myeloischen DCs. Sie können sowohl eine TH1- als auch eine TH2-Antwort induzieren [134,144]. Damit wurde ein Meilenstein für die Forschung an Dendritischen Zellen gelegt, da dies ein einfaches

Verfahren darstellt, mit dem eine große Zahl Dendritischer Zellen gewonnen werden kann. Dendritische Zellen stellen lediglich 0,1 - 0,9% der Blutleukozyten dar und die Isolation aus nativem Gewebe ist sehr aufwändig. Da die MoDCs außerhalb des Körpers und damit außerhalb ihrer natürlichen Umgebung entstanden sind, lassen sich ihr Verhalten und ihre Reaktion auf verschiedene Stimuli mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht immer ohne weiteres auf das Immunsystem *in vivo* übertragen, da dort eine Vielzahl an zusätzlichen Faktoren auf die Zellen einwirken.

### *1.3.2.7 Dendritische Zellen der Lunge – Beteiligung beim allergischen Asthma*

In den 1980er Jahren beschrieben Sertl et al. eine den Langerhanszellen ähnliche Subpopulation der Dendritischen Zellen in Lungenepithel, Lungenparenchym und der viszeralen Pleura bei Mäusen und Menschen. Auch hier haben sie sehr wahrscheinlich die Funktion, inhalative Pathogene in sich aufzunehmen und zu regionalen Lymphknoten zu wandern, da sie als Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus vermehrt ins Lungengewebe rekrutiert werden [145]. Untersuchungen von mittels BAL (bronchioalveoläre Lavage) gewonnenen DCs des bronchialen Epithels zeigen, dass sie eine gewisse Ähnlichkeit mit Langerhanszellen der Haut aufweisen. Sie exprimieren wie diese CD1a, Langerin und Birbeck-Granula [146]. Normalerweise hält sich die Fähigkeit pulmonaler DCs, T-Zellen zu stimulieren in Grenzen, da wenige kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche exprimiert werden. Erst nach der Wanderung in regionale Lymphknoten erhalten sie die Fähigkeit, mit T-Zellen zu interagieren. Eine Studie zeigte jedoch, dass bei einer allergischen Entzündung auch DCs, die noch in den Atemwegen verweilen, CD40, B7-2 und ICAM-1 hochregulieren, was zu einer verfrühten Reifung führt [147].

### *1.3.2.8 Rolle der Dendritischen Zellen beim allergischen Asthma bronchiale*

Studien der späten 1990er Jahre haben gezeigt, dass Dendritische Zellen eine entscheidende Rolle bei der Antwort des Immunsystems auf körperfremde Antigene spielen. Als Antigenpräsentierende Zellen in Haut, Lunge und verschiedenen anderen Organen stehen sie an der Schnittstelle zwischen Körper und Außenwelt. Die Unterscheidung zwischen pathogen und nicht pathogen bzw. fremd und eigen wird

durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellen des Immunsystems geregelt. Die Dendritischen Zellen haben dabei die Aufgabe zu entscheiden, welcher Weg der Immunantwort eingeschlagen wird. Ist diese Homöostase gestört, kann es zu Allergien oder Autoimmunerkrankungen kommen. Bei Allergien werden vermehrt TH2-Zellen gebildet, ein Prozess, der durch Antigenpräsentierende Zellen initiiert wird. Der Sensibilisierungsprozess auf inhalative Antigene und die damit verbundene vermehrte Bildung von TH2-Zellen fängt in jungen Jahren an und wird sowohl durch genetische Faktoren als auch durch Umweltbedingungen wie Infektionen in der Kindheit und Auseinandersetzung mit Krankheitserregern beeinflusst [148]. Anhand eines Asthma-Mausmodells hat sich gezeigt, dass die Dendritischen Zellen der Atemwege nicht nur für die Sensibilisierung auf inhalative Antigene sondern auch für die Aufrechterhaltung der allergischen eosinophilen Inflammation entscheidend sind [149]. Alveoläre durch BAL gewonnene Makrophagen von Patienten mit allergischem Asthma präsentieren den TH2-Zellen Allergen, während dies die pulmonalen Makrophagen von Nichtallergikern nicht tun [150]. Bei der Entwicklung eines allergischen Asthmas bei Mäusen durch Inhalation niedriger LPS-Dosen sind es die Dendritischen Zellen, die eine TH2-Sensibilisierung induzieren [5]. Dendritische Zellen besitzen hochaffine IgE-Rezeptoren. Durch Histamin, PGD<sub>2</sub> (Prostaglandin 2), cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) werden Dendritische Zellen dazu angeregt, naive T-Zellen in Richtung TH2 zu drängen. Deshalb werden sie DC2-Zellen genannt. Im Gegensatz dazu stehen die DC1-Zellen, die, durch IFN- $\gamma$  polarisiert, IL-12 in großen Mengen sezernieren und dadurch das TH1/TH2-Gleichgewicht in Richtung TH1 verschieben. Dieses Gleichgewicht ist unter anderem von der Allergendosis, der Dauer der Allergenexposition sowie der Bindungsaffinität zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen abhängig [151].

Neuere Studien weisen darauf hin, dass Dendritische Zellen unter anderem durch die Produktion von IL-10 und damit der Bildung regulatorischer T-Zellen auch eine periphere Toleranz erzielen können [152,153].

### *1.3.2.9 Rolle von Antigenpräsentierenden Zellen bei der Produktion von Neurotrophinen*

Die Untersuchungen zu Antigenpräsentierenden Zellen im Zusammenhang mit den Neurotrophinen sind bisher lückenhaft und die Ergebnisse teilweise kontrovers. NGF wird von Makrophagen sezerniert und NGF sowie BDNF von aus humanem Blut isolierten Monozyten [74,154].

MoDCs, die mit LPS stimuliert werden, zeigen eine stark erhöhte Expression von NGF sowie von TrkA [154]. Eine andere Studie zeigte, dass NGF zusammen mit TrkA bei Monozyten und Makrophagen protektiv wirkt, da eine Ligandenaktivierung die Zellen vor Apoptose bei UV-Bestrahlung oder Gliotoxin-Einwirkung schützt [155]. Zu Dendritischen Zellen gibt es bisher keine hinreichenden Untersuchungen bezüglich einer Expression von Neurotrophinen. Lediglich der Nachweis der Expression der Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC gelang auf Dendritischen Zellen, die aus Lymphgewebe isoliert worden waren [156].

### *1.3.2.10 Die GTPasen – Bedeutung für die Funktion Dendritischer Zellen*

Bei den GTPasen handelt es sich um Enzyme, die Signale an den Zellkern vermitteln, um die Aktivierung eines bestimmten Gens und den darauf folgenden zellulären Effekt durch Exprimierung des entsprechenden Proteins zu erreichen. Die Rho-GTPasen gehören zur Superfamilie von Ras. Exogene Signale aktivieren durch Ras PI3K, die p38 MAPK/MAPK aktivierende Proteinkinase 2 und den c-Raf/ERK pathway. MAPK (*Ras-mitogen-activated protein kinase*) und ERK (*extracellular signal regulated kinase*) wiederum aktivieren die RSK (pp90 Ribosomale S6-Kinasen), die zur Familie der Ser/Thr-Kinasen gehören. Diese induzieren eine Phosphorylierung der CREB-Kinase (*cyclic adenosine monophosphate response element binding protein*), die wiederum CREB aktiviert. CREB fördert das Überleben von Zellen und eine Inhibition von CREB an Serin133 bewirkt eine Apoptose [157,158].

Zur Ras-Superfamilie gehören auch die kleinen GTP bindenden Proteine der Cdc42/Rac/Rho-Familie. Sie sind an der Reaktion der Zellen auf Wachstumsfaktoren

beteiligt und spielen eine große Rolle in Vorgängen der Zelle wie Gen-Transkription, Zellzyklus und Zelladhäsion sowie in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Rho, Rac und Cdc42 wurden erstmals in Swiss 3T3-Fibroblasten beschrieben. Rac1 stimulierte die Bildung von Aktinfilamenten und den damit assoziierten Adhäsionen und „*membrane ruffling*“ (Membraneinstülpungen), Vorgänge, die auch von Rho abhängig sind [159]. Bisher sind beim Säugetier 10 verschiedene Rho-GTPasen identifiziert worden. Da Rac und Rho zu den wichtigsten Vertretern gehören, wurden die Untersuchungen hierauf beschränkt. Rac, Rho und Cdc42 fungieren als molekulare Schlüsselstelle und pendeln zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Form hin und her. Bisher sind über 30 GEFs (*guanosin nucleotid exchange factors*) mit katalytischer Aktivität bekannt [160]. In ihrer aktiven Form sind sie in der Lage, mit ihren Zielmolekülen zu interagieren, um so eine Reaktionskaskade in Gang zu setzen. Dieser Zyklus wird durch eine intrinsische GTPase, die die Proteine in ihre GDP-gebundene Form zurückführt, vollendet. Die Adhäsion und Migration von Leukozyten an und durch die ECM (*extracellular matrix*) zum Ort der Entzündung ist für die Funktion des Immunsystems von vitaler Bedeutung.

D'Souza-Schorey et al. zeigten, dass die Expression einer mutierten Form von Rac auf T-Lymphozyten eine starke Wanderung und Adhäsion nach sich zog. Gleichzeitig konnten Veränderungen im Zytoskelett beobachtet werden. Auch Rho scheint maßgeblich an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt zu sein. Im Makrophagen-Chemotaxis-Assay wird Rho für die Migration benötigt. Möglicherweise besteht seine einzige Aufgabe darin, Aktin-Myosin-Filamente auszubilden, um der Zelle Bewegung zu ermöglichen [161]. Allen Ras- und Rho-GTPasen gemeinsam ist die Vielfalt an Rezeptoren und Signaltransduktionswegen, durch die sie ihre Wirkung entfalten, die Vielfalt an ihren Zielen innerhalb der Zelle und nicht zuletzt der intensive Dialog der verschiedenen Signaltransduktionswege untereinander [162].

Dendritische Zellen durch die Formation von Dendriten charakterisiert. Der Ausbildung dieser Prozesse wird eine maßgebliche Rolle für ihre Funktion, nämlich die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen, zugeschrieben. *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Ausbildung der Dendriten verschiedene Signaltransduktionsmechanismen erfordert. Die Ausbildung von Membranprozessen

wird vom Aktin-Zytoskelett gesteuert und von den Rho-GTPasen (RhoA, Rac1 und Cdc42) kontrolliert. Dies zeigte sich, nachdem man die Rho-GTPasen mit Toxin B blockiert hatte. Unreife DCs waren nicht mehr in der Lage, Dendriten auszubilden und bei reifen DCs wurde die Zellmotilität blockiert [163].

### **1.4 Inflammatorische Zytokine – inflammatorische Stimuli**

Inflammatorische und regulatorische Zytokine sind wichtige Mitspieler in der Regulation des Immunsystems, da sie verschiedene Zellen zur Differenzierung anregen und inflammatorische Prozesse in Gang setzen. Daher sind sie für das Überleben eines Organismus von essentieller Bedeutung. Bei Erkrankungen, bei denen das Immunsystem aus dem Gleichgewicht gekommen ist, wie beispielsweise Allergien und Autoimmunerkrankungen gilt ihnen größeres Interesse, da sie zum großen Teil verantwortlich für das hier herrschende zelluläre Ungleichgewicht sind. Jenes betrifft bei Allergien besonders die T-Zellen. Für das Zustandekommen einer allergischen Reaktion wird vor allem eine zu starke Proliferation von TH2-Zellen verantwortlich gemacht, welche dann wie oben beschrieben den Krankheitsverlauf in Gang setzen. Hier sollen als Beispiel einige wichtige Zytokine angeführt werden, die mit den Dendritischen Zellen interagieren und in der Pathogenese des allergischen Asthmas eine entscheidende Rolle spielen.

Als unspezifische Stimuli für Zellen der unspezifischen Körperabwehr agieren Pathogene wie beispielsweise Viren, Bestandteile von Bakterien, körperfremde DNA, u.v.m. Einen besonders starken Stimulus stellt LPS (Lipopolysaccharid) dar, ein Baustein der Zellwand gramnegativer Bakterien, der in dieser Arbeit als unspezifischer Stimulus für die Reifung von MoDCs verwendet wurde.



### 1.4.1 Interleukin-4

IL-4 hat einen Einfluss auf viele Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Dendritische Zellen, B-Lymphozyten und Gewebszellen wie Fibroblasten. Hier übt das Zytokin immunmodulatorische Funktionen aus. Es wird nach bisherigen Untersuchungen vor allem von Mastzellen und aktivierten TH2-Zellen sezerniert. Die hauptsächliche Quelle für das Zytokin bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Sein kodierendes Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert [164]. Der IL-4-Rezeptor ist sehr ähnlich strukturiert wie der Rezeptor für IL-13, was bedeutet, dass die beiden Zytokine als klassische TH-2-Zytokine nahezu dieselben Wirkungen im Immunsystem ausüben [165,166]. Bei allergischen Reaktionen und inflammatorischen Vorgängen kommt IL-4 eine Schlüsselrolle zu. Bei Allergenexposition kommt es durch eine erhöhte Produktion von IL-4 zu einem Shift zu TH2-Zellen, und dadurch zu einer erhöhten Allergiewahrscheinlichkeit [167]. Außerdem kommt es durch IL-4 zu einer erhöhten Rekrutierung von B-Lymphozyten, die wiederum IgE ausschütten, einer vermehrten Rekrutierung von Eosinophilen, einer erhöhten Schleimproduktion und Kontraktion von glatten Muskelzellen in den Bronchien [168].

### 1.4.2 Interleukin-6

Bei IL-6 übt regulatorische Funktionen in immunologischen Vorgängen und der Hämatopoese aus und spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Akute-Phase-Reaktionen. Es vermittelt unter anderem die Entwicklung und Differenzierung von Lymphozyten, Proliferation und Überleben von Zellen sowie Steuerung apoptotischer Signale [169]. Außerdem übt IL-6 Einfluss auf die Knochenbildung und das Hormonsystem aus [170]. Zahlreiche zirkulierende und gewebsständige Zellen reagieren auf IL-6, unter anderem Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Lungengewebszellen und Astrozyten. Zu seinen Signaltransduktionsmechanismen gehören die MAPK und die PI-3-Kinase (*phosphatidylinositoltriphosphat kinase*). So wie IL-4 übt auch IL-6 eine wichtige Funktion bei Entstehung allergischer Erkrankungen aus. Eine erhöhte IL-6-Produktion zieht eine vermehrte Differenzierung naiver T-Zellen zu TH2-Zellen nach sich. Außerdem inhibiert durch Dendritische Zellen sezerniertes IL-6 die

suppressiv Funktion regulatorischer T-Zellen und führt auf diese Weise zu einer verminderten peripheren Toleranz [171]. Dendritische Zellen des Lungengewebes produzieren als Antwort auf ein Fremdantigen IL-6, was wiederum IL-12, ein Zytokin, das eine TH1-Antwort induziert, inhibiert. Dies geschieht, um chronisch entzündliche TH1-Antworten zu verhindern. Auf diese Weise kommt es zu einem TH2-Shift [172].

### 1.4.3 Interleukin-10

Bei IL-10 handelt es sich um ein regulatorisches Zytokin inflammatorischer Reaktionen. Seine Produktion erfolgt vor allem durch Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen (*natural killer cells*) sowie TH1- und TH2-Zellen [173-175]. Seine Wirkung entfaltet IL-10 vor allem durch die Aktivierung von Jak1 (Januskinase 1) und Tyk2 (Tyrosinkinase 2), die zur Familie der Janus-Tyrosinkinasen gehören [176]. In seiner Anwesenheit differenzieren vermehrt regulatorische T-Zellen. Auf diese Weise inhibiert es allergische und auch Gewebszellen Reaktionen [177]. Bei T-Zellen, die neben dem TCR das kostimulatorische Molekül CD28 besitzen, kann IL-10 durch dessen Inhibierung antiproliferative Effekte auf T-Zellen und damit periphere Toleranz induzieren [178]. Es ist in der Lage, die IgE-Produktion herunterzufahren und gleichzeitig IgG4 heraufzuregulieren [179]. Außerdem induziert IL-10 eine Reduktion inflammatorischer Zytokine wie GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-5 und reguliert die Funktion von Eosinophilen herunter [180]. Auch Monozyten und Makrophagen werden von IL-10 negativ beeinflusst [174].

### 1.4.4 Interleukin-12

IL-12, ein zur Familie der heterodimeren proinflammatorischen Zytokine gehörendes Protein, wird in erster Linie von Antigenpräsentierenden Zellen wie Monozyten und Makrophagen sowie Dendritischen Zellen produziert und bewirkt eine Differenzierung naiver T-Zellen zu TH1-Zellen. Außerdem induziert IL-12 zusammen mit IL-18 die Produktion von Interferon- $\gamma$  durch NK-Zellen. Wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  regt es die Funktion zytotoxischer T-Zellen, aktivierten Makrophagen und NK-Zellen an. Durch all diese Wirkungen fördert IL-12 vor allem die zelluläre Immunität. Ein Mangel

an IL-12, möglicherweise unter anderem hervorgerufen durch Stresshormone und Histamin mit gleichzeitig erhöhter Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-4 und IL-13 begünstigt die Entstehung allergischer Erkrankungen [181,182].

### 1.4.5 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

TNF- $\alpha$  ist ein 17 kDa schweres Protein mit 157 Aminosäuren, das in der Lage ist, eine Reihe strukturverwandter Rezeptoren zu aktivieren [183]. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an seine Rezeptoren setzt Signalkaskaden der Zellen in Gang, die schließlich Effekte wie Differenzierung, Aktivierung, Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren und Apoptose induzieren [184]. TNF- $\alpha$  spielt eine bedeutende Rolle in entzündlichen Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale. Die Stimulation verschiedener proinflammatorischer Zytokine sowie TNF- $\alpha$  führt durch einen autokrinen Effekt zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen unter anderem durch Mastzellen [185]. TNF- $\alpha$  wird außerdem von einer Reihe proinflammatorischer Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile Granulozyten und Gewebszellen wie Fibroblasten, Epithelzellen und glatte Muskelzellen ausgeschüttet. Seine entzündlichen Eigenschaften entfaltet TNF- $\alpha$  durch proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  [186].

### 1.4.6 Transforming Growth Factor- $\beta$

Von TGF- $\beta$  existieren mehrere Isoformen, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3, die untereinander bis zu 80% Homologie in ihrer Aminosäuresequenz zeigen, aber dennoch unterschiedliche Funktionen ausüben. Hier wird besonders das Augenmerk auf TGF- $\beta$ 1 gerichtet. Ähnlich wie IL-10 ist auch TGF- $\beta$ 1 ein regulatorisches Zytokin, dessen Abwesenheit zu schweren autoimmunen Störungen führen kann. Dagegen wirkt eine Überexpression von TGF- $\beta$ 1 protektiv gegen eine Überreaktion des Immunsystems. TGF- $\beta$ 1 wird vor allem für die Differenzierung regulatorischer T-Zellen benötigt. Hier induziert es unter anderem die Bildung von IL-10 [187].

## 1.6 Zielsetzung

Die Neurotrophine sind Proteine mit vielfältigen Eigenschaften. Sie sind am Überleben und der Plastizität des peripheren und zentralen Nervensystems beteiligt, besitzen aber auch zytokinähnliche Eigenschaften. Verschiedene Zellen des Immunsystems produzieren Neurotrophine, sind aber auch in der Lage, durch Expression der Neurotrophin-Rezeptoren auf diese zu reagieren. Bei allergischen Erkrankungen fand man stark erhöhte Neurotrophinspiegel sowohl im Serum als auch bei der BAL nach segmentaler Allergenprovokation [90]. Die für das allergische Asthma bronchiale bekannte Hypereagibilität könnte zum einen im Zusammenhang mit einer erhöhten Neurotrophinproduktion stehen. Zum anderen scheinen Neurotrophine eine Rolle bei Entzündungen zu spielen.

Als Antigenpräsentierende Zelle kommt der Dendritischen Zelle eine Schlüsselrolle im Immunsystem zu. Das wirft die Frage auf, durch welche Mechanismen sie an der Entstehung von Erkrankungen des Immunsystems beteiligt ist.

Allergische Erkrankungen wie das allergische Asthma bronchiale und die allergische Rhinitis sind gekennzeichnet durch eine TH2-Antwort, welche dann über oben beschriebene Mechanismen die bekannten Symptome hervorrufen. Die Dendritischen Zellen können durch Hochregulierung bestimmter kostimulatorischer Signale eine TH2-Antwort initiieren und damit eine allergische Entzündung entfachen [147].

Der Schritt zwischen Antigenpräsentierender Zelle und TH2-Zellen ist bisher nur unzureichend geklärt. Die Neurotrophine sind möglicherweise an diesem Schritt beteiligt.

Aus diesen Fragen ergaben sich für diese Arbeit folgende Ziele:

- Produzieren, speichern und sezernieren MoDCs die Neurotrophine NGF und BDNF?
- Ist diese Produktion durch spezifische und unspezifische Simulation mit Allergenextrakt und LPS beeinflussbar?
- Werden die hochaffinen Neurotrophin-Rezeptoren von MoDCs exprimiert?
- Werden durch Stimulation mit Neurotrophinen Entzündungsmediatoren ausgeschüttet, die eine Th2-Immunantwort begünstigen?
- Wie werden die Signaltransduktionsproteine Rho und Rac durch Neurotrophine beeinflusst?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Materialien für Zellseparation und Zellkultur

##### 2.1.1.1 *ex vivo* generierte CD16<sup>+</sup> Monozyten und *ex vivo* isolierte Langerhanszellen

Die Monozyten werden aus 100ml peripherem Blut von Probanden aufgereinigt. Die Langerhanszellen wurden *ex vivo* aus humaner Haut, die aus Mammareduktionsplastiken stammt, isoliert s.u.

##### 2.1.1.2 *Isolation von Monozyten und Langerhanszellen*

50ml Perfusorspritze	
EDTA	Merck, Darmstadt, D
PBS-H	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Dispase I	Roche, Mannheim, D
Trypsinlösung	
45ml PBS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Trypsin	Biochrom, Berlin, D
DNase	Roche, Mannheim, D
DNase-Lösung	
PBS (5mM Mg <sup>2+</sup> )	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
FCS	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
DNase	Roche, Mannheim, D
Humanes Serum Serotyp AB	Biochrom, Berlin, D
MACS CD 16 Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-CD1a Mikrobeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
mouse mAK	
Ficoll Histopaque	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
PBS Dulbecco pH 7,3 (Phosphate buffered saline)	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

##### 2.1.1.3 *Medium und Zytokine für Zellkultur*

IL-4	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
GM-CSF	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
LPS (Lipopolysaccharid)	Calbiochem
NGF	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
BDNF	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
Polymyxin	Biochrom KG, Berlin, D
Streptomycin	Biochrom KG, Berlin, D
RPMI 1640 Medium + Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Linz, A
FCS ( <i>fetal calv serum</i> )	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

##### 2.1.1.4 *Lösungen und Puffer*

Ficoll Histopaque	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
PBS Dulbecco pH 7,3 ( <i>phosphate buffered saline</i> )	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

### MACS-Puffer:

PBS	Gibco, BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
EDTA	Merck, Darmstadt, D
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Sigma, Deisenhofen, D

### 2.1.2 Materialien für FACS und Immunfluoreszenz

PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich Chemie Taufkirchen, D
AB-Serum	Biotest AG, Dreieich, D
Peptidgeblockte rabbit AK	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
FITC-labelled AK	Jackson, Soham, UK
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, San Diego, CA, USA)

### Waschpuffer

PBS Dulbecco	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Saponin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FCS	Gibco BRL Life Technology

### 2.1.3 Materialien für Western Blot

#### *2.1.3.1 Probengewinnung für Western Blot*

### RIPA-Puffer

Tris-HCL	Sigma, Deisenhofen, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
Nonident P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen, D
PMSF (Phenylmethan-sulfonylfluorid)	Sigma, Deisenhofen, D
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen, D
Proteaseinhibitoren	Sigma, Deisenhofen, D

#### *2.1.3.2 Proteinbestimmung*

Bradford Protein Assay Kit	Bio-Rad, Ca, USA
----------------------------	------------------

#### *2.1.3.3 Western Blot*

### Lämmli-Puffer

Glycerin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
SDS	Merck, Darmstadt, D
DTT (Dithiotretol)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D

### Laufpuffer

Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
SDS	Merck, Darmstadt, D

### Blotpuffer

Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Glycin	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
TBSt (Tris buffered saline + 0,05% Tween 20)	Merck, Darmstadt, D

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Tween20	Merck, Darmstadt, D
Tris Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Molecular Weight Standard	BioRad, Hercules, Ca, USA
NGF, BDNF, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Positivkontr. Für TrkA, TrkB	HMC-1-Zellen
Acrylamid	Polysciences, Inc., USA
Bisacrylamid	Polysciences, Inc., USA
APS (Ammoniumpersulfat)	Polysciences, Inc., USA
TEMED	BioRad, Ca, USA
(Tetramethylethyldiamin)	
PVDF-Membran	Schleicher und Schuell, Keene, Nh, USA
Blockpuffer	Lycor, Lincoln, NE
<u>Antikörper</u>	
Polyklonaler rabbit anti-human	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, AK USA
Donkey anti-rabbit AK	Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA

### 2.1.4 Material für PCR

#### 2.1.4.1 RNA-Isolation

RNeasy Kit	Quiagen, Valencia, CA, USA
------------	----------------------------

#### 2.1.4.2 Reverse Transkription

cDNA Synthesis Kit	Böhringer, Indianapolis, IN, USA
--------------------	----------------------------------

#### 2.1.4.3 PCR

Taq-Polymerase	Person Elmer, Roche Inc., Branchburg, NJ, USA
Reaction Buffer	Person Elmer, Roche Inc., Branchburg, NJ, USA
Primer	MWG Biotech, Ebersberg, D
Thermocycler	MWG Biotech, Ebersberg, D

#### PCR-Master-Mix

Zusammensetzung: 2,5µl Primer (0,4µmol/L)  
1,0µl Taq-Polymerase (1,5U)  
1,0µl Nukleotide (0,2mmol)  
5,0µl Pufferlösung  
89µl H<sub>2</sub>O



#### 2.1.4.4 Übersicht der Primer

**NGF** (167bp)

Upstream TAA-AAA-GCG-GCG-ACT-CCG-TT

Downstream ATT-CGC-CCC-TGT-GGA-AGA-TG

**BDNF** (296bp)

Upstream AGC-CTC-CTC-TGC-TCT-TTC-TGC-TGG-A

Downstream CTT-TTG-TCT-ATG-CCC-CTG-CAG-CCT-T

**TrkA** (229bp)

Upstream TCT-TCA-CTG-AGT-TCC-TGG-AG

Downstream AGA-CCT-CTG-GGC-CAC-CTC-TT

**TrkB** (648bp)

Upstream CTT-TTG-GTA-ATG-CTG-TTT-CTG

Downstream CGC-GGC-GAT-CTG-CTG-GGC-TAT

#### 2.1.4.5 Agarose-Gelelektrophorese DNA

Probenpuffer:

Tris-Acetat

Sigma, Deisenhofen, D

EDTA

Merck, Darmstadt, D

Glycerin

Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, D

Bromphenolblau

Merck, Darmstadt, D

Agarose

Amresco, Solon, Ohio, USA

Ethidiumbromid

Sigma, Deisenhofen, D

100bp Leiter

Gibco BRL™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

#### 2.1.5 Materialien für ELISA

##### 2.1.5.1 Lösungen

Waschpuffer

0,1 % Tween 20

Merck, Darmstadt, D

in PBS, pH 7,2 - 7,4

Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Reagenzlösung

3 % BSA

Sigma, Deisenhofen, D

in PBS, pH 7,2 - 7,4

Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Blockpuffer

PBS Dulbecco

Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

+ 3% BSA

Sigma, Deisenhofen, D

+ 0,5% Sucrose

Sigma, Deisenhofen, D

Streptavidin-Horseradish

Pierce Perbio Sciences GmbH, Bonn, D

-Peroxidase (HRP)

Substrat für Zytokin-ELISA

R&D Systems

1:1 Farbreagenz A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

und Farbreagenz B

(Tetramethylbenzidine)

Substrat für Neurotrophin-ELISA

Pierce Perbio Sciences GmbH, Bonn, D

Pierce TMB Kit

Pierce Perbio Sciences GmbH, Bonn, D

Schwefelsäure 20%

Merck, Darmstadt, D

### 2.1.5.2 Lösungen für TNF- $\alpha$ -ELISA

Waschpuffer

0,05 % Tween 20 Merck, Darmstadt, D  
 in PBS, pH 7,2 - 7,4 Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Blockpuffer

5 % Tween 20 Merck, Darmstadt, D  
 in PBS Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Reagenslösung

1,4 % entfettetes Rinderserum Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D  
 0,05 % Tween 20 Merck, Darmstadt, D

in PBS, pH 7,2 - 7,4 Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

### 2.1.5.3 Lösungen für TGF- $\beta$ ELISA

HCl Merck, Darmstadt, D

HEPES Merck, Darmstadt, D

NaOH Merck, Darmstadt, D

### 2.1.5.4 Übersicht der verwendeten Antikörper

	Hersteller	Konzentration	Bereich der Standardkurve
<b>NGF</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	2,24 $\mu$ g/ml	1000–16,25pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	50 ng/ml	
<b>BDNF</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	2 $\mu$ g/ml	1000–15,513pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	50 ng/ml	
<b>IL-4</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	2,24 $\mu$ g/ml	2000–31,25 pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	200ng/ml	
<b>IL-6</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	2 $\mu$ g/ml	2000–31,25 pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	200ng/ml	
<b>IL-10</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	4 $\mu$ g/ml	4000–62,5 pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	400ng/ml	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	2 $\mu$ g/ml	1000–15,513pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	75ng/ml	
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>			
<u>Primärantikörper</u>	R&D Systems	360 $\mu$ g/ml	2000-31,25pg/ml
<u>Sekundärantikörper</u>	R&D Systems	54 $\mu$ g/ml	

### 2.1.6 Material Immunpräzipitation

Anti p-TrkA	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
Anti p-Trk	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
Protein A Agarose	BioRad, Hercules, CA, USA
Anti-TrkA und B	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA

### 2.1.7 Material Rho und Rac Pull down assay

<u>Lysepuffer</u>	
Tris, pH 7.2	Merck, Darmstadt, D
Triton X-100	
sodium deoxycholate	
SDS	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, D
Leupeptin	
Aprotinin	
Phenylmethylsulfonylfluorid	
Glutathion-Sepharose-Beads	Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA
GST-rhotekin-RBD	
Streptavidin-Agarose	
CRIB peptide	

### 2.1.8 Laborgeräte

Akku-Pipettboy	Hirschmann, D
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
CO <sub>2</sub> -Brutschrank BB 6220 CM	Heraeus, Hanau, D
DMBRE Fluoreszenz Mikroskop	Bensheim, D
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim, D
FACS-Calibur	BD Biosciences, Oxnard, CA, USA
Filter sets	Omega Optical, Seefeld, D
Halogenlampe	Seefeld, D
Hamamatsu Digitalkamera C4742-05,	Herrsching, D
Leica 40Wasserimmersions-	Seefeld, D
Gelelektrophoresekammer	BioRad
2 Glasplatten für Minigels	
2 Spacer (Abstandhalter)	
1 Halterung zu, Gelgießen	
1 Elektrophoresekammer	Life Technologies
Neubauer-Zählkammer	Neubauer
Pipetten 2µl, 10µl/25µl/100µl/	Eppendorf Netheler Hinz GmbH
500µl/1000µl	
Photometer	Thermomax, Molecular Decices, Ca, USA
Schüttler	Edmund Bühler, D
Sonfier cell disruptor	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
Thermomixer	Eppendorf Netheler Hinz GmbH
Tischzentrifuge	Eppendorf Netheler Hinz GmbH
Ultrazentrifuge	Eppendorf Netheler Hinz GmbH

Vortex  
Zellkulturzentrifuge

Jahnke & Kunkel, Berlin, D  
Heraeus, D

### 2.1.9 Sonstige Materialien

Bakterienschale	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Cell Scraper	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf Netheler Hinz GmbH
Falcon Reaktionsgefäße 15ml/50ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
6 Well Plates	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
LS positive selection columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
LS negative selection columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
miniMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
PCR-Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PVDF-Membran	Amersham Pharmacia Biotec, UK
Filterpapier	Amersham Pharmacia Biotec, UK
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
Separationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zellfilter 40µ, Nylon	BD, Heidelberg, D
21 gauche-Kanüle	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
23 gauche-Kanüle	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
96 Loch Nunc Mirotiterplatte	Nunc, Wiesbaden, D

## **2.2 Methoden**

### 2.2.1 Probandenkollektiv

#### *2.2.1.1 Blutspender*

Insgesamt wurden 35 Personen im Alter von 23 bis 60 Jahren untersucht, davon 17 Allergiker und 18 Nichtallergiker. Die Probanden wurden aufgeklärt und willigten in die Untersuchung ein. Die Allergien wurden anamnestisch erfragt und mittels eines Haut-Prick-Tests verifiziert. Bei allen allergischen Probanden bestand eine Allergie gegen Birkenpollen. Es wurden 50ml-Perfusorspritzen verwendet, in die vorher 5 ml EDTA (6%) gegeben wurde. Jedem Probanden wurde 100ml venöses Blut abgenommen.

#### *2.2.1.2 Spender für Hautmaterial*

Die Proben für die Isolation von Langerhanszellen stammen von Spenderinnen, die sich einer Mammareduktionsplastik unterzogen und wurden von verschiedenen Kliniken Berlins bezogen. Hier konnte keine Unterscheidung zwischen Allergikern und Nichtallergikern gemacht werden.

### 2.2.2 Zellseparation und Generierung Dendritischer Zellen aus peripheren CD14<sup>+</sup>Monozyten

#### *2.2.2.1. Gewinnung mononukleärer Zellen mit Ficoll Histopaque*

Zunächst wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. Dann wurde jeweils 25 ml dieses Gemischs auf 15 ml Ficoll Histopaque (Densitiy 1.077) aufgeschichtet und bei 1200 RPM 30 min lang zentrifugiert. Hierbei trennten sich die Blutbestandteile so auf, dass sich die Erythrozyten und Granulozyten unten befanden, das Serum oben, das Ficoll in der Mitte und der Lymphozytenring direkt über dem Ficoll. Der Lymphozytenring wurde vorsichtig mit einer 1000ml-Pipette abgenommen, in ein separates 50ml-Gefäß gebracht, und dreimal mit PBS gewaschen (5min, 900 RPM).

### *2.2.2.2 Immunomagnetische Isolation von peripheren CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels MACS (magnet associated cell sorter)*

Mit dieser Methode können Zellen in einer sehr großen Reinheit gewonnen werden. In diesem Fall wurde eine Negativselektion durchgeführt, indem ein Antikörpercocktail verwendet wurde, der alle Zellen mit Ausnahme der Monozyten herausfilterte. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der CD14<sup>+</sup> Positivselektion liegt darin, dass „*untouched*“ CD14<sup>+</sup> Monozyten gewonnen werden können. Damit wurden sie isoliert, ohne dass ein Antikörper an ihrer Oberfläche gebunden hatte. Hier wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten isoliert, zirkulierende Blutzellen, die als Vorläufer der Dendritischen Zellen fungieren. Nach der Zentrifugation mit Ficoll Histopaque und Absaugen des Lymphozytenrings werden die Zellen mit 60 µl MACS-Puffer resuspendiert und die 20 µl Blocklösung und 20 µl Antikörper-Cocktail mit einer 100 µl-Pipette hineinpipettiert. Die Inkubationszeit betrug 5 min bei 8-10°C. Danach wurden die Zellen wieder dreimal mit MACS-Puffer gewaschen, mit 60 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20 µl Micro-Bead-Lösung wieder bei 8-10°C 15 min inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe, nach denen die Zellen mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und in eine Säule pipettiert wurden, die vorher dreimal mit jeweils 5 ml entgastem MACS-Puffer vorgespült worden war und unter die vorher ein 15 ml-Eppendorf-Gefäß gestellt wurde. Die Säule wurde hinterher verworfen und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

### *2.2.2.3 Zellzahlbestimmung*

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Jeweils 8µl Zellsuspension wurden in die obere und untere Kammer pipettiert. Dann wurden die Zellen in den vier Eckquadraten ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Da die Monozyten größer sind als andere Blutzellen, konnte eine Verunreinigung mit anderen Zellen relativ sicher ausgeschlossen werden. Die absolute Zellzahl wurde anhand folgender Formel errechnet:

Verdünnungsgrad x 10 (Multiplikationsfaktor, um die Schichtdicke von 0,1mm auf 1mm hochzurechnen) x Mittelwert der vier ausgezählten Quadrate.

#### *2.2.2.4 Immunoselektion*

Die Langerhanszellen wurden freundlicherweise von Dr. Matthias Peiser, Institut für Molekularbiologie, Arnimallee 22, 14195 Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Methode soll hier trotzdem kurz beschrieben werden.

Mit dieser Methode wurden Langerhanszellen aus Nativgewebe gewonnen. Durch ihren Oberflächenmarker CD1a konnten sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. In diesem Fall wurde Hautgewebe aus Mammareduktionsplastiken verwendet, die von einigen Kliniken mit plastischer Chirurgie in Berlin zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Zunächst wurden die humanen Epidermiszellen isoliert. Dafür wurden die Präparate zunächst vorbereitet, gewaschen, 16h lang bei 6°C inkubiert und das Enzym Dispase hinzugegeben. Dispase löst Hemidesmosomen der Basallamina der Epidermis und Kollagen Typ VII. Die von der Dermis abgelöste Epidermis wurde in Portionen von jeweils 30g mit 25ml Trypsin 15min bei 37°C inkubiert. Trypsin spaltet Desmosomen und Cadherine. Nach Zentrifugation durch einen Nylon-Zellfilter wurde 10% FKS hinzugegeben, um die Trypsinisierung abzustoppen, nochmals zentrifugiert und die Petrischalen mit DNase-Lösung gewaschen. Diese Suspension wurde mit den Zellpellets zu einer Einzelzellsuspension resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde nochmals 5min bei 260g zentrifugiert, die Pellets mit 10% FKS resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und mit Trypanblau gefärbt. Die Isolierung der Langerhanszellen erfolgt wie unten beschrieben mittels MACS. Es wurden Langerhanszell-spezifische CD1a Mikrobeads verwendet.

### 2.2.3 Zellkultur

#### *2.2.3.1 Generierung von unreifen MoDCs aus peripheren CD14<sup>+</sup>Monozyten*

Die mit dem MACS gewonnenen CD14<sup>+</sup>Monozyten wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS und 5% Streptomycin in einer 6 Well-Schale kultiviert. Es wurde 1 ml Medium pro 10<sup>6</sup> Zellen benutzt. Die Simulation der Zellen erfolgte mit jeweils 2µl GM-CSF und Il-4/1ml Medium (Konz. 50µg/ml). Am dritten und am fünften Tag wurde die Hälfte des Mediums ausgetauscht und 2µl Il-4 ersetzt.

#### *2.2.3.2 Differenzierung von unreifen MoDCs zu reifen Dendritischen Zellen*

Am siebten Tag erfolgte die Stimulation mit LPS und Allergen (Birke). Hierzu wurden drei unterschiedliche Konzentrationen LPS (0,1 µg/ml Medium, 1,0 µg/ml Medium und 5 µg/ml Medium) verwendet. Das Allergen wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzugegeben. In das sechste Well wurde Allergen mit einer Konzentration von ebenfalls 5 µg/ml und zusätzlich 10 µg/ml Polymyxin, das den LPS-Anteil des Allergens ausschalten soll, pipettiert, um die Wirkung des reinen Allergenanteils erfassen zu können.

### 2.2.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflusszytometrie wird als Standardmethode verwendet, um bestimmte Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine intakter Zellen zu bestimmen. Das heutzutage hauptsächlich verwendete FACS (*fluorescence activated cell sorter*) hat zum einfachen Durchflusszytometer zusätzlich die Fähigkeit, die Zellen zu sortieren, anstatt sie nur zu detektieren. Auch für die Bestimmung der Reinheit und Viabilität der Proben stellt die Durchflusszytometrie eine gute Methode dar. Die Unterscheidung der einzelnen Zellpopulation geschieht anhand von Größe, Granularität und der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle mittels eines Lasers und wird durch die Konjugation der spezifischen Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen möglich ge-



macht. Sehr häufig verwendet werden FITC (*fluoresceinisothiocyanat*) und PE (Phycoerythrin), so auch in dieser Arbeit. Zellbestandteile, die an FITC markierte Antikörper binden, leuchten grün bei einer Wellenlänge von 503nm, während PE markierte Antikörper bei einer Wellenlänge von 650nm oranges Licht abstrahlen. Für die Bestimmung der Viabilität kann PI (Propidiumjodid) verwendet werden, dessen Emissionsbereich bei 610nm liegt. Der Farbstoff sendet rotes Licht aus und lagert sich in toten Zellen an, da deren Membran durchlässiger als die viabler Zellen ist. Auf diese Weise kann der Prozentsatz apoptotischer Zellen ermittelt werden. Um intrazelluläre Proteine zu detektieren, müssen die Zellen vorab permeabilisiert werden.

### *2.2.4.1 Intrazellulärer Nachweis von NGF, BDNF und NT-3*

Es wurden pro Ansatz ca.  $10^5$  Zellen benutzt. Zunächst wurden sie mit 0,5ml Cytofix (4% Paraformaldehyd) resuspendiert, damit eine Einzelzellsuspension entsteht und mit FACS-Puffer gewaschen (200g/7min). Um sie zu permeabilisieren, wurden sie mit 2ml 0,025% Saponin resuspendiert. Saponin lagert sich an integrale Membranproteine an und ermöglicht so die Diffusion von Antikörpern in die Zelle. Nach dem Waschen und der Abnahme des Überstandes wurde das Restvolumen von ca. 200µl 1 Stunde mit 50µl Antikörperserum, das 20µl Antikörper gegen NGF, BDNF oder NT-3 oder eine Subtypkontrolle enthält, inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit 2ml Saponin-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,1% Saponin) gewaschen. Danach wurde der *secondary anti-rabbit FITC conjugated antibody*, der Sekundärantikörper, aufgetragen und erneut eine Stunde inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen wieder gewaschen und mit dem FACS Calibur Cytometer analysiert.

### *2.2.4.2 Nachweis der hochaffinen spezifischen Neurotrophin-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen*

Für den Nachweis der Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC auf der Zelloberfläche ist keine Permeabilisierung der Zellen notwendig. Ansonsten läuft der Versuch genauso ab wie der intrazelluläre Nachweis von Proteinen.

### 2.2.4.3 Bestimmung der Reinheit und Viabilität

Um sicherzustellen, dass ein Shift von Monozyten zu Dendritischen Zellen stattgefunden hat, wurde am Tag der Isolation eine FACS-Messung mit anti CD14-FITC *labelled* AK durchgeführt und am 7. Tag nach der Stimulation wurde eine Messung des Oberflächenmoleküls HLA-DR vorgenommen, da die Hochregulierung dieses Moleküls ein Indikator für die Reifung von Monozyten zu Dendritischen Zellen darstellt. Dafür wurden 2 Röhrchen mit jeweils 1000000 Zellen zentrifugiert (1000rpm, 10min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit jeweils 50µl AB-Serum resuspendiert. Nun wurden jeweils 10µl der FITC-markierten Antikörper hinzugegeben und 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Resuspension in 500µl PBS erfolgte sofort im Anschluss die Messung mit dem FACS Calibur.

Die Viabilität wurde durch die Messung mit PI bestimmt. Dafür wurden 100000 mit 50µl PI (Konz. 50µg/ml) vermischt, 15min bei 4°C inkubiert, mit 500µl PBS resuspendiert und mit dem FACS Calibur gemessen.

### 2.2.5 PCR (polymerase chain reaction)

Mit dieser Methode kann ein kurzer DNA-Strang amplifiziert werden und damit schon mit sehr geringen Mengen DNA das gesuchte Fragment nachgewiesen werden. Benötigt werden zwei Primer, die den Anfang und das Ende des zu bestimmenden DNA-Fragments bestimmen, eine Taq-Polymerase, die aus *Thermophilus aquaticus*, einem Bakterium, das aus heißen Quellen stammt und somit hitzeunempfindlich ist, stammt und Oligonukleotide, die als Bausteine für die zu amplifizierende DNA fungieren [188].

Die PCR besteht aus verschiedenen Einzelschritten. Zunächst wird die DNA bei 95°C denaturiert, das heißt die Doppelstränge werden voneinander getrennt, indem ihre Disulfidbrücken aufgebrochen werden. Daraufhin lagern sich bei 40-60 °C die Primer an den gesuchten Abschnitt der Einzelstränge an. Dieser Vorgang wird „*annealing*“ genannt. Zum Schluss folgt die Elongation. Hierbei wird der DNA-Abschnitt, der durch die Primer determiniert wurde, durch die Polymerase amplifiziert. Dies geschieht bei Temperaturen zwischen 68 und 72°C. Dieser Vorgang wird 20-30mal

wiederholt, wobei die verdoppelte DNA-Sequenz wiederum als Vorlage für die Primer und die Polymerase dient. Zum Schluss wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Durch eine am Gel angelegte Spannung werden die einzelnen DNA-Sequenzen anhand ihrer Größe sortiert, da die kürzeren Sequenzen schneller zum Pluspol wandern als die größeren. In diesem Fall wurde eine RT-PCR durchgeführt, das heißt als Ausgangsmaterial diente RNA, die zuerst in DNA umgeschrieben werden musste.

### *2.2.5.1 Gewinnung der Gesamt-RNA*

Um eine PCR durchführen zu können, muss zunächst DNA oder, wie in diesem Fall, RNA aus den Proben gewonnen werden. Es wurden jeweils  $10^6$  Dendritische Zellen sowie Keratinozyten verwendet. Zunächst wurden die Zellen mit 350  $\mu$ l RLT-Puffer homogenisiert. Danach wurde 1225  $\mu$ l 100% Ethanol hinzugegeben und gevortext. Die Suspensionen wurden nun in Portionen von 700  $\mu$ l in die Mini spin columns gefüllt und 15sec bei 10.0000 RPM zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die gesamten Proben die Säulen durchlaufen hatten. Die Flüssigkeit, die die Säulen passiert hatte, wurde jedes Mal verworfen. Nun wurden die Säulen zweimal mit jeweils 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen (15sec, 10.000RPM). Wieder wurde der Durchfluss verworfen. Nach erneuter 1minütiger Zentrifugation bei 10.000RPM wurden nun die Säulen in 1,5ml Tubes gehängt und jeweils 50  $\mu$ l RNase freies Wasser hinzupipettiert. Wieder wurde 1min bei 10.000 RPM zentrifugiert, um die Gesamt-RNA zu gewinnen. Die RNA-Proben konnten entweder sofort weiterverarbeitet oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zu 6 Monaten gelagert werden.

### *2.2.5.3 Reverse Transkription*

Die cDNA-Synthese wurde nach Angaben des Herstellers durch die AMV Reverse Transkriptase und Oligo(dT)-Primer katalysiert. Es wurde ein Gesamtvolumen von jeweils 20  $\mu$ l verwendet, davon 8,2  $\mu$ l RNA-Probe und eine Mischung wie folgt: 2  $\mu$ l 10x Reaction Buffer, 2  $\mu$ l Deoxynukleotid-Mix, 1  $\mu$ l RNase-Inhibitor, 4  $\mu$ l 25mM  $\text{MgCl}_2$  (5mM), 2  $\mu$ l Oligo-p (dT)-Primer (0,04U), 0,8  $\mu$ l AMV Reverse Transkriptase.

### *2.2.5.4 PCR und Agarose-Gelelektrophorese*

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt. Zu 20µl PCR Master Mix kamen 5µl zu amplifizierende DNA. Im Thermozykler wurde folgendes Programm eingestellt:

Zunächst wurde 5min bei 96°C erhitzt, um sicherzugehen, dass sich alle DNA-Stränge voneinander getrennt hatten. Diesen Schritt nennt man Initialisierung.

Der folgende Zyklus wird 36mal wiederholt:

1 min bei 94°C

1 min bei 60°C

1 min bei 74°C

Das Produkt konnte nun mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden.

Hier wurde 1,5% Agarosegel verwendet. Zunächst wurde die Agarose mit 50ml TAE-Puffer auf 100°C erhitzt und unter stetigem Rühren auf 50°C abgekühlt. Nun wurde 5µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Hieraus wurde ein Gel in einer Kammer gegossen und ein Probenkamm hineingesteckt. Nach der Polymerisierung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in Laufpuffer (0,5x TAE) gelegt. Nach Zugabe von Probenpuffer mit Farbmarkern zu den DNA-Proben wurden Proben sowie DNA-Leiter in die Slots gespritzt und eine elektrische Spannung angelegt. Die Auftrennung erfolgte bei 65 Volt ca. 45min. An der Farbfront konnte abgeschätzt werden, ob die Stränge sich hinreichend aufgetrennt hatten.

Da das in die DNA eingelagerte Ethidiumbromid in ultraviolettem Licht fluoresziert, kann das Gel unter einer UV-Lampe begutachtet werden. Mit Hilfe einer Polaroidkamera wurde das Gel fotografiert.

### *2.2.6 SDS-PAGE und Western Blot*

Bei dieser Methode wird ein bestimmtes Protein mittels eines spezifischen Antikörpers visualisiert. Das Verfahren wurde erstmals 1981 durch Burnette beschrieben. Alle im Zelllysat vorhandenen Proteine werden durch 2D-Gel-Elektrophorese in einem Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt und mit einem Sandwichverfahren mit Gel, Filtern und Polstern

auf eine Membran transferiert (Nitrozellulose oder PVDF). Dabei werden die Proteine durch das SDS denaturiert, d.h. sie verlieren ihre Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur. Hier wurden Minigels benutzt, die in Verbindung mit dem Tank-Blot-System verwendet wurden. Dieses unterscheidet sich vom auch häufig verwendeten Semi-Dry-Blot-System nur hinsichtlich des Aufbaus und der Puffermenge. Die aufgetrennten Proteine werden dabei über ein senkrecht zum Gel und Membran angelegtes isoelektrisches Feld auf die Membran transferiert. Hierbei können die Proteine wieder teilweise renaturieren. Dabei bleibt das Muster der in dem Gel aufgetrennten Proteine erhalten, was z.B. mit einer Panseau S-Färbung gezeigt werden kann. Hierbei werden unspezifisch alle Proteine auf der Membran angefärbt. Bevor nun die spezifische Färbung mit Antikörpern erfolgt, muss die Membran mit einer Blocklösung inkubiert werden, um die unspezifischen Proteinbindungen auszuschalten.

Bei der Antikörperfärbung wird zunächst ein Primärantikörper aufgetragen, dann ein gegen den Primärantikörper gerichteter enzymgekoppelter oder fluoreszenzkonjugierter Sekundärantikörper. Der Vorteil eines Sekundärantikörpers liegt darin, dass an einen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden können und dadurch das Signal verstärkt wird. Außerdem sind die Sekundärantikörper universell einsetzbar. Der Nachweis kann nun durch Entwicklung mit einem Röntgenfilm erfolgen oder, wie in diesem Fall, kann das Protein mit einem speziellen Scanner sichtbar gemacht werden.

### *2.2.6.1 Gewinnung von Zelllysaten und Proteinbestimmung*

Um die Proteine mit dieser Methode nachweisen zu können, mussten die Proteine denaturiert werden. Das geschah wie folgt: Zunächst wurde das Medium 5 Minuten bei niedriger Umdrehungszahl bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals bei selbigen Bedingungen mit PBS gewaschen und dieses wurde dann vorsichtig abgenommen. Pro Tube können  $2 \times 10^7$  Zellen verarbeitet werden. Dann wurden 1,0 ml eiskalter RIPA-Puffer und frisch aufgetaute Protease-Inhibitoren hinzugegeben, das Ganze mit einer Pipette resuspendiert und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Nun wurden die Zellen mit einer 21er-Nadel homogenisiert. Dabei galt es aufzupassen, dass die Temperatur des Lysats konstant niedrig blieb. Danach wurde

10µl PMSF-Stocklösung hinzugegeben und die Pellets wieder 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als letzten Schritt wurden die Zellen 10 Minuten bei 4°C bei 10.000 RPM/min zentrifugiert. Die Überstände stellten die Zellysate dar, das Pellet wurde verworfen. Nun wurden die Lysate gemessen werden oder bei -30°C eingefroren.

### *2.2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford*

Um den Proteingehalt der Proben zu bestimmen, wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Reaktion relativ unempfindlich ist. Durch die Bindung des Proteins an den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der anionischen Form des Farbstoffes, die ihr Absorptionsmaximum bei 595 nm hat. Diese Zunahme ist das Maß für den Proteingehalt des Lysats. Nach der Extinktion kann anhand der Eichgerade, die mit bekannten Proteinmengen hergestellt wird, der Proteingehalt der Proben errechnet werden [189].

Zunächst wurde die aus BSA bestehende Standardreihe, dann die Proben zu je 10µl auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Hinzu kamen jeweils 200µl Bradford-Reagenz. Nach 30minütiger Inkubationszeit wurden die Proben und Standards bei 595nm gegen Wasser als Leerwert photometrisch gemessen. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass alle Proben ungefähr gleichviel Protein enthielten.

### *2.2.6.3 Durchführung SDS-PAGE und Western Blot*

Es wurden jeweils zwei Gele benutzt. Zum Gießen der Gele wurden die zuvor mit Ethanol gereinigten Glasplatten mit den Spacern in die Halterung eingespannt und zunächst die Lösung für das Trenngel bis ca. 3cm unter dem oberen Rand mit einer 1000er-Pipette gegossen und danach mit Wasser überschichtet. Damit die Lösung zu einem Gel polymerisieren konnte, musste es 1h bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Danach wurde das Wasser abgegossen, das Sammelgel bis ca. 1 cm unter dem oberen Rand eingefüllt und der Probenkamm mit 8 Taschen in das Gel eingesetzt. Das Sammelgel hat die Funktion, die Proteine so zu bahnen, dass sie möglichst gerade laufen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele

in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die dafür vorgesehenen Kammern mit Laufpuffer angefüllt. Die Gele bestehen aus einem Gemisch aus Acrylamid, Bisacrylamid, APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetraethylmethyldiamin). Für die Neurotrophine wurde 10-20% Trenngel verwendet, für die hochaffinen Rezeptoren 7,5% Trenngel. Das Sammelgel hatte jeweils eine Konzentration von 3%. Die Kämme wurden nun entfernt und die Probestaschen mit Laufpuffer gespült. Zuerst wurde in die erste Tasche jedes Gels 10µl des Größenmarkers (*Molecular Weight Standard*), aufgetragen, dann die Proben, die zuvor 1:1 mit Laemmli-Puffer vermischt und dann bei 95°C im Wasserbad 5min erhitzt worden waren, um die Proteine zu denaturieren. Es wurde jeweils 50µg Protein im entsprechenden Volumen aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde bei NGF und BDNF das jeweilige rekombinante Protein verwendet, bei TrkA und TrkB Lysate aus Eosinophilen. Die denaturierten Proben wurden dann bei 80mA ca.1h 30min laufen gelassen, bis das Bromphenolblau am unteren Rand des Gels angekommen war. Damit die Gele nicht überhitzten, wurde die Apparatur in eine mit Eiswürfeln gefüllte Box gestellt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde die Halterung auseinandergebaut, die Gele von den Glasplatten gelöst und einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die vorher auf die Größe der Gele zurechtgeschnittenen Pads, Filter und PVDF-Membranen wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und dann zwei Sandwiche daraus geformt, bei denen sich die Membran innen befindet, die Filter darüber und die Polster außen. Das Ganze wurde mit einer Kammer verschlossen und in Transferpuffer ein elektrisches Feld bei konstanter Spannung von 30V senkrecht zur Membran angelegt. Nach einer Stunde wurde der Strom abgeschaltet, die Apparatur auseinandergebaut und die Membranen, auf denen sich nun das Proteinmuster der Gele befindet, entnommen. Die Banden des Markers wurde mit Kugelschreiber gekennzeichnet. An einer Ecke wurden die Membranen eingeschnitten, um hinterher die richtige Seite zu finden. Nachdem die Membranen über Nacht mit Blockpuffer inkubiert worden waren, wurden sie dreimal jeweils 10 min mit PBS Tween gewaschen, der Primärantikörper aufgetragen und nach 1h Inkubationszeit erneut dreimal gewaschen. Dann wurde der fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper aufgetragen, der erneut 1h einwirken muß. Zum Schluß musste noch dreimal

gewaschen werden, davon zweimal mit PBS Tween, der letzte Waschvorgang erfolgte mit PBS ohne Tween. Um das entsprechende Protein zu visualisieren, wurden die Membranen mit Infrarot Imaging System (Lycor) analysiert.

### 2.2.7 ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Beim ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zur Proteinbestimmung, das nach der Sandwichmethode mit spezifischen Antikörpern durchgeführt wird. Als Grundlage dient ein primärer Antikörper, mit dem die Platte gecoatet wird und der mit seinem Fc-Teil an der Plastikoberfläche haften bleibt. Darauf werden die Proben gegeben und ein Epitop des gesuchten Proteins wird vom Fab-Teil des Coating-Antikörpers gebunden. Der biotinylierte Sekundärintikörper bindet wiederum das gesuchte Protein. Durch Zugabe des HRP-gekoppelten Tertiärintikörper (*Horse-Radish-Peroxidase*) und seines Substrats TMB (Tetramethylbenzidin) wird eine Farbreaktion in Gang gesetzt. Es lässt sich an der Blaufärbung mit bloßem Auge erkennen, wie viel Protein ungefähr enthalten sein muss. Die Extinktion kann nun photometrisch gemessen werden. Anhand der Eichgeraden wird die Proteinmenge der Proben errechnet.

#### 2.2.7.1 Durchführung

##### Vorbereitung der Proben

Nach 24h wurden 300µl pro 1 ml des Überstandes abgenommen, in beschriftete Eppendorf-Tubes gefüllt und bei -30°C eingefroren. Nach 48h wurden die Zellen mit dem *Cell Scraper* vom Boden der 6 Well-Platten entfernt, die Zellsuspension in 1,5ml Eppendorf-Tubes zentrifugiert und die Überstände abgenommen, die dann bei -30°C eingefroren wurden. Zunächst wurden die Zellen mit jeweils 0,5 ml PBS/1 Mio. Zellen resuspendiert. Dann wurden sie jeweils ca. eine halbe Minute per Ultraschall lysiert. Die Lysate und Überstände konnten nun per ELISA gemessen werden.



### Vorbereitung der Platten

Zunächst wurden die Platten gecoatet, das heißt der Coating-Antikörper wurde in der entsprechenden Konzentration in PBS gelöst und sofort auf einer 96 Well-Platte zu je 100 µl pipettiert, abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Wells wurden nun geleert und dreimal mit Waschpuffer mittels einer 25ml Pipette gewaschen. Nach jedem Auffüllen wurden die Wells geleert und auf Papiertüchern abgeklopft. Vor dem Auftragen der Proben müssen die Wells trocken sein. Nun wurde jeweils 300 µl Blockpuffer pro Well aufgetragen, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde die Platte wieder gewaschen wie oben beschrieben.

### Durchführung des Assays

100 µl bzw 50 µl der in Reagenzlösung aufgelösten Standards und der zu messenden Proben wurden nun je zweimal zwecks Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Protein für die Standardreihe wurde mit Reagenzlösung verdünnt. Die Platte wurde wie oben beschrieben gewaschen. 100 µl pro Well des in Reagenzlösung gelösten Sekundäran-tikörpers wurden aufgetragen. Die Platte wurde wieder gewaschen. Danach wurde 100µl HRP-Lösung (Konzentration siehe oben) in jedes Well aufgetragen und abgedeckt, da es vermieden werden muss, die Platte direktem Licht auszusetzen. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde die Platte gewaschen und 100µl pro Well der Substratlösung aufgetragen. Die Inkubationszeit soll höchstens 20 Minuten betragen. Sobald die Flüssigkeit in den Wells stark blau wurde, wurde die Reaktion mit 50µl 1 M Schwefelsäure gestoppt, ohne vorher gewaschen zu werden.

Zum Schluss wurde die Extinktion mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Anhand der Standardreihe wurde die entsprechende Proteinkonzentration errechnet.

Bei TGF-β1 galt es folgendes zu beachten. Zunächst wurde die Standardlösung nach dem Verdünnen mit Reagenz vor dem Auftragen 15 min bei RT auf dem Schüttler auf niedriger Stufe stehengelassen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen wie folgt aktiviert. Zunächst wurde 0,1ml 1N HCl pro 500 µl Probe hinzupipettiert, auf dem Vortex geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben wieder neutralisiert, indem 0,1ml 1N NaOH/0,5 M HEPES hinzugegeben und wieder gevortext wird. Der Assay wurde nun nach Protokoll s.u. durchgeführt. Bei der Messung galt es zu beachten, dass der Verdünnungsfaktor nun 1,4 betrug.

### Lösungen für die Aktivierung der Proben

1N HCl: (100ml) Zu 91,67ml deionisiertem Wasser wurde langsam 8,33ml 12 N HCl hinzupipettiert und gut vermischt. 1,2N NaOH/0,5 M HEPES (100ml): Zu 75ml deionisiertem Wasser wurde langsam 10 N NaOH hinzupipettiert und gut vermischt. Danach wird 11,9g HEPES hinzugegeben, wieder gut vermischt und mit deionisiertem Wasser auf 100ml aufgefüllt.

#### *2.2.7.2 Statistische Auswertung*

Die Ergebnisse errechnen sich aus den Mittelwerten unter Berücksichtigung des Standardfehlers. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe des nichtparametrischen Tests für verteilungsunabhängige Werte verglichen (Mann-Whitney-U-Test). Hierzu wurde Version 10 von SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant determiniert.

#### 2.2.8 Immunfluoreszenz

Die Monozyten wurden zunächst wie oben beschrieben 6 Tage kultiviert und dann von den Platten mittels eines Cell Scrapers geerntet. Per FACS wurde kontrolliert, ob ein Shift von CD14 zu HLA-DR positiven Zellen stattgefunden hatte. Dann wurden sie auf ihre Neurotrophin-Expression hin angefärbt. Dafür wurden zunächst die Fc-Rezeptoren blockiert, indem PBS, das 10% humanes Serum enthält, hinzu gegeben und 20 min bei 4°C inkubiert wurde. Die intrazelluläre Färbung wurde mit Cytofix/Cytoperm durchgeführt. Die MoDC wurden nun mit 10 µl *neurotrophin rabbit anti-*

*human* Antikörper 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde mit PBS gewaschen. Nun wurde mit 5500µl PBS I *FITC-labelled donkey anti-rabbit IgG* 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte 10 Waschvorgänge und anschließend die Begutachtung unter dem Mikroskop. Es wurde ein Leica DMRBE Fluoreszenz- mikroskop mit einer Hg Lampe, ein Leica x 40 Water-Immersion Objectiv, Filter-Sets von Omega Optical und eine Hamamatsu-Digitalkamera C4742-95 verwendet. Die Bilder wurden mit dem Programm Openlab software (Improvision, Heidelberg, D) gemacht.

### 2.2.9 Nachweis der Rezeptorphosphorylierung – Immunpräzipitation

Um zu untersuchen, ob die Neurotrophine eine Wirkung auf Dendritische Zellen über die hochaffinen spezifischen Rezeptoren TrkA und TrkB ausüben, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Diese Methode ist dafür geeignet, da diese Rezeptoren durch Phosphorylierung aktiviert werden. Hierfür wurden Proben aus den Neurotrophin-Stimulations-Assays verwendet. Es wurde jeweils 100µg Protein verwendet. Zuerst mussten die Rezeptoren aus dem Zelllysat entnommen werden, wofür jedes Zelllysat mit 10µg Primärantikörper (polyklonaler *rabbit anti-human* Ab) eine Stunde bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert wurde.

### 2.2.10 Rho und Rac GTPase Pull Down Assay

Monomere p21 GTP bindende Proteine (kleine GTPasen) fungieren als molekulare Schnittstelle bei der Regulation einer Vielzahl von biochemischen Vorgängen in eukaryoten Zellen. Die Familien von Ras und Rho (eingeschlossen Cdc42, Rac1, Rho und Rap 1) sind hier von besonderem Interesse, da sie die Antwort der Zelle auf die sich verändernde Umwelt beeinflussen. Es hat sich im Laufe der Zeit herausgestellt, dass diese Proteine zahlreiche Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Transformation, Apoptose, Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Progression des Zellzyklus regulieren [162]. So wie andere G-Proteine kursieren die kleinen GTPasen zwischen einem inaktiven GDP gebundenen und einem aktiven GTP gebundenen Stadium.

Mit dem Rho und Rac GTPase activity assay wird die Aktivität der kleinen GTPasen gemessen, indem man sie mittels ihrer nachgeschalteten Effektoren isoliert [190]. Die entsprechende bindende Domäne des nachgeschalteten Effektors jeder GTPase wird als GST-Fusionsprotein exprimiert. Wenn man es inaktiviert, kann es dazu verwendet werden, die aktive oder GTP gebundene GTPase herauszuziehen. GST-RBD (Ras bindende Domäne) von Raf1 kann die aktive Form von Ras und Cdc42 herausziehen. Die GST-Rhotekin-RBD kann aktives Rho herausziehen [190]. Die so gewonnene aktive GTPase kann dann mittels Western Blot mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden.

Hier wird die Aktivität des GTP gebundenen Rho bestimmt. Lysate aus sowohl stimulierten als auch unstimulierten Zellen werden benutzt. Zunächst müssen die Zellen lysiert werden. Dies geschieht mit eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 7.2, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µg/ml leupeptin, and aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Die Lysate werden nun 45 min mit Glutathion-Sepharose-Beads (Amersham Biosciences), die an mit rhotekin-RBD fusioniertes GST gekoppelt sind, inkubiert. Dann wird 4x mit jeweils 600 µl eiskaltem Tris buffer, der 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µg/ml leupeptin und aprotinin, und 0.1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid enthält, gewaschen. Nach der Zugabe von Laemmli-Puffer können die Proben per SDS-PAGE analysiert werden. Das GTP gebundene Rho wurde mittels GST-rhotekin-RBD präzipitiert. Die Rho- und Rac-Aktivitäts-Assays wurden gleichzeitig durchgeführt, indem 1 µg CRIB peptide zum Vorgang der Zelllyse hinzugegeben wird. Das CRIB peptide gebundene GTP-Rac wurde nach der Zugabe von Streptavidin-Agarose präzipitiert. Die Proteine wurden zum Schluss per SDS-PAGE nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern detektiert.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zellseparation und Zellkultur

##### 3.1.1 Gewinnung peripherer CD14<sup>+</sup>Monozyten

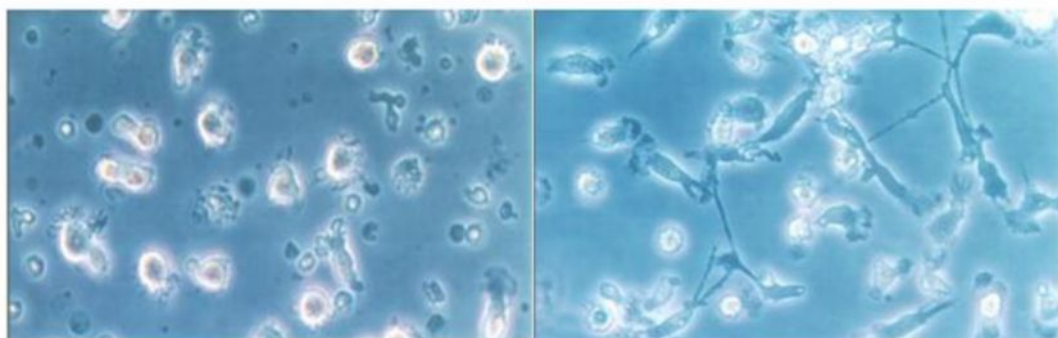
Bei der immunomagnetischen Isolation von Monozyten aus jeweils 100ml Vollblut konnten durchschnittlich 50 Mio. Zellen gewonnen werden. Die Anfärbung mit Trypanblau wurde als Indikator für die Viabilität benutzt und zeigte, dass die Zellen zu >95% viabel waren, was nochmals durch Untersuchung mittels FACS bestätigt wurde.

##### 3.1.2 Langerhanszellen

Es wurden ca. 50 Mio Langerhanszellen mit einer Reinheit von >95% geliefert.

#### 3.2 Zellkultur

Durch die Stimulation der Monozyten mit GM-CSF und IL-4 differenzierten die Monozyten zu unreifen MoDCs. Ein Großteil der Zellen adhärierte nach einigen Tagen an der Plastikoberfläche. Nach Stimulation mit LPS zeigten sie eine Vielzahl an Dendriten.



Monozyten, Tag 1 der Stimulation

MoDCs, Tag 6 der Stimulation

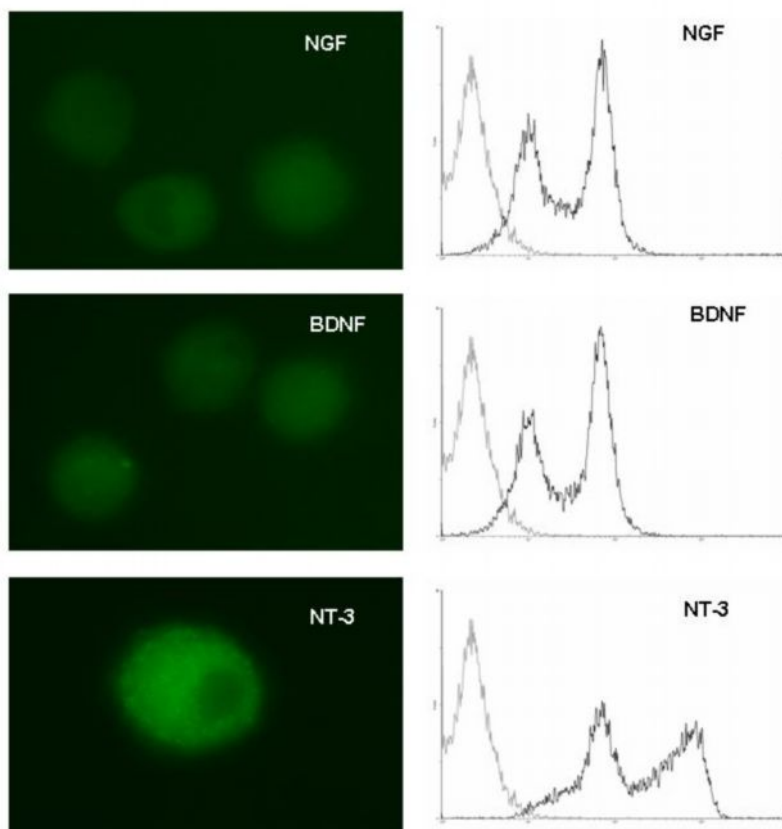
Abb.5

### 3.2.1 Durchflusszytometrie

Durch Verwendung der FITC-konjugierten anti-CD14 IgG und anti-HLA-DR wurde sichergestellt, dass eine Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen stattgefunden hatte. Auch die Neurotrophin- und Rezeptorexpression auf intakten Dendritischen Zellen ließ sich mit dieser Methode sehr gut nachweisen. Anhand der Verschiebung der Kurve nach rechts wird die Intensität der Fluoreszenz dargestellt. Die Untersuchung zeigte, dass Dendritische Zellen sowohl NGF, BDNF und NT-3 als auch die Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC enthalten. Die stärksten Signale zeigten sich bei NT-3 und TrkA. (*Abb.5 und Abb.6*)

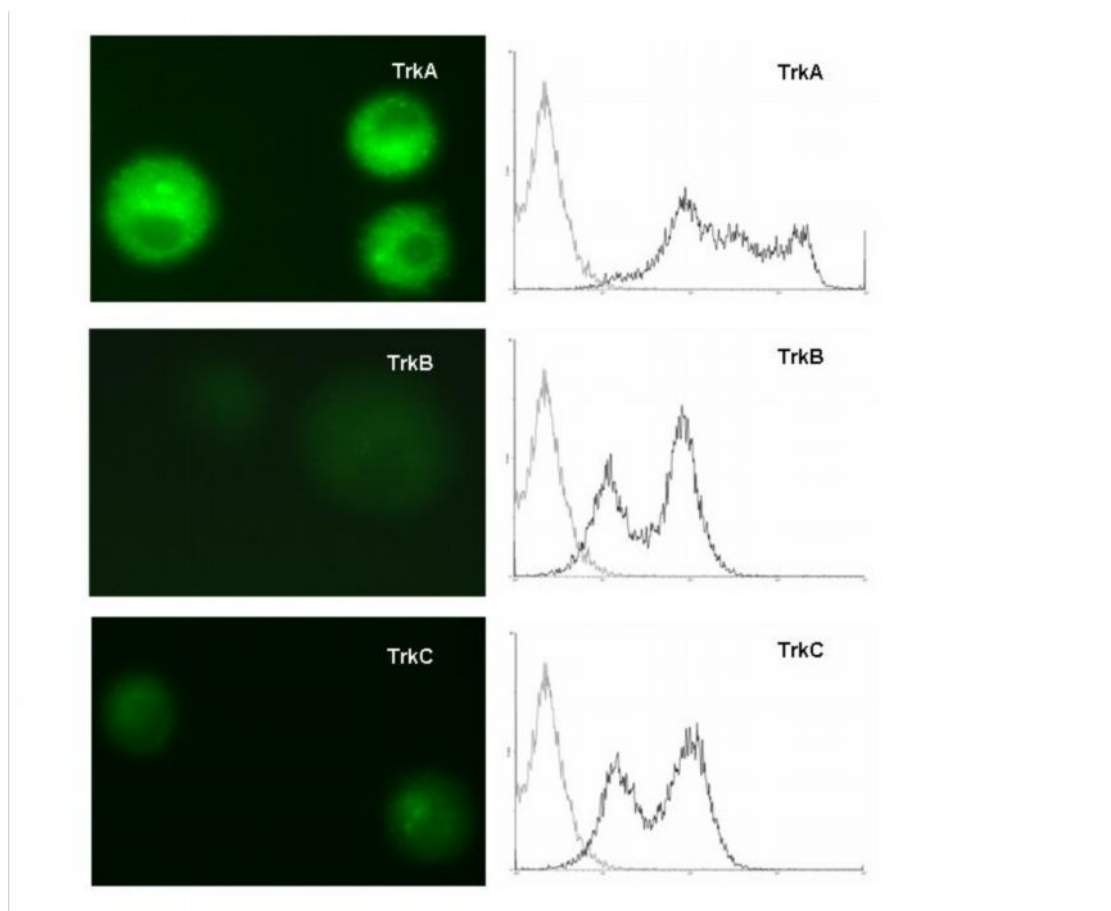
### 3.2.2 Immunfluoreszenz - Detektion von fluoreszierenden Neurotrophinen and Rezeptoren auf humanen MoDCs

MoDCs wurden nach 7tägiger Kultur in mit GM-CSF and IL-4 versetztem Medium auf intrazelluläre Expression von Neurotrophinen und ihre Rezeptoren mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden helle Signale bei TrkA and NT-3 gefunden. NGF, BDNF and TrkC fluoreszierten schwächer, aber es wurde in allen untersuchten Zellen ein Signal gefunden. Helle Spots, die auf eine Proteinakkumulation hinweisen, zeigten sich vor allem im Bereich des Golgi-Apparats. TrkB zeigte eine schwache Fluoreszenz.



*Abb.6* Immunfluoreszenz und FACS. Alle Neurotrophine sind auf Dendritischen Zellen nachweisbar. Neurotrophine. NT-3 zeigt in beiden Versuchen die stärkste Intensität.

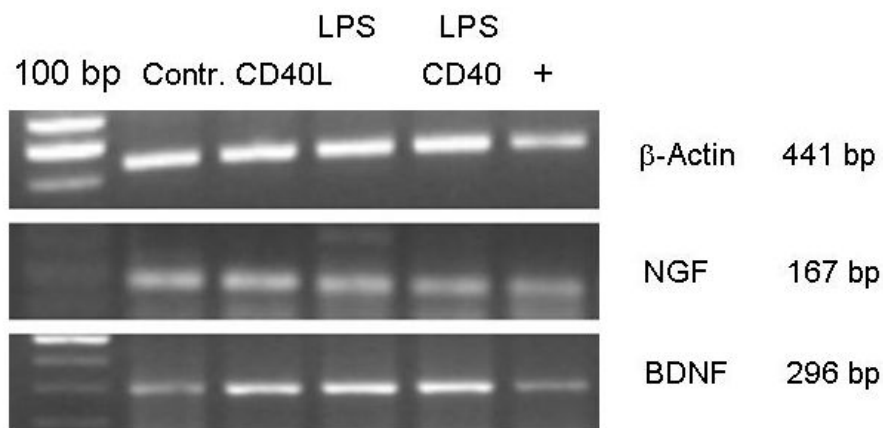




*Abb.7:* Die hochaffinen spezifischen Rezeptoren. Vor allem bei TrkA zeigt sich sowohl bei der Immunfluoreszenz als auch beim FACS das stärkste Signal.

### 3.3 RNA-Isolation und RT-PCR

Jede der RNA-Proben aus isolierten Langerhanszellen zeigte so wie bei der Positivkontrolle aus Keratinozyten Amplifikationsprodukte in erwarteter Größe und Intensität. Im Größenbereich der Neurotrophine NGF und BDNF wurden Banden sichtbar, was für die Anwesenheit der dieser Proteine kodierenden RNA spricht. Im Bereich von BDNF bewirkte eine Stimulation mit LPS und CD40L eine stärkere Expression. TrkB wurde selektiv durch Stimulation mit LPS und CD40L hochreguliert.



*Abb. 8:* Sowohl NGF als auch BDNF konnten in Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit LPS und CD40L bewirkte bei BDNF eine stärkere Intensität der Banden.

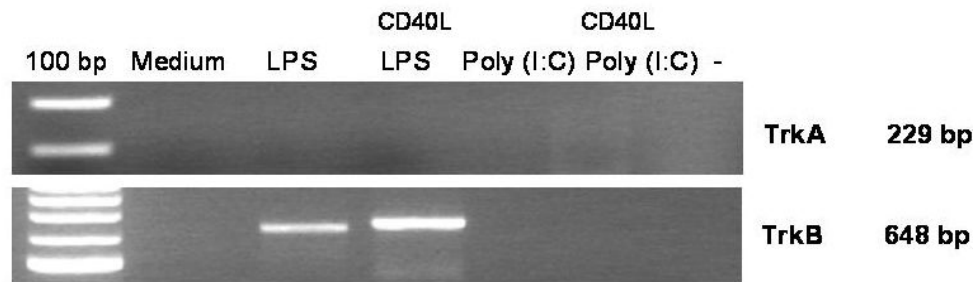


Abb.9: TrkB wird selektiv durch Stimulation mit LPS und CD40L hochreguliert.

### 3.4 SDS-PAGE und Western Blot

Um die Expression der Neurotrophine und ihrer Rezeptoren auch auf der Proteinebene zu untersuchen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Antikörperfärbung durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente für NGF und BDNF das jeweilige rekombinante Protein und für TrkA und TrkB Lysate aus HMC-1-Zellen, über die bekannt ist, dass sie Neurotrophine und ihre Rezeptoren exprimieren [72]. Es zeigten sich spezifische Banden für TrkA und TrkB sowie NGF und BDNF. Diese waren nur bei den Proben der Allergiker zu beobachten, während bei Nichtallergikern keine Banden sichtbar wurden. Im Bereich von BDNF war zu beobachten, dass eine Stimulation mit LPS eine leichte Hochregulation bewirkt, während dies bei NGF, TrkA und TrkB nicht der Fall ist.

Neben den ganzen Rezeptoren konnte im Bereich von TrkA auch eine „truncated“ Form identifiziert werden. Die Spezifität der Antikörper war vorher durch Inkubation mit Blocklösung sichergestellt worden.

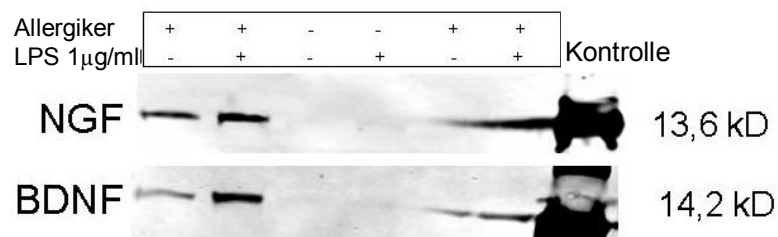


Abb. 10: Bei den Allergikern zeigten sich im Bereich von NGF und BDNF spezifische Banden. Eine Stimulation mit LPS wirkte bei BDNF eine leichte Hochregulierung.

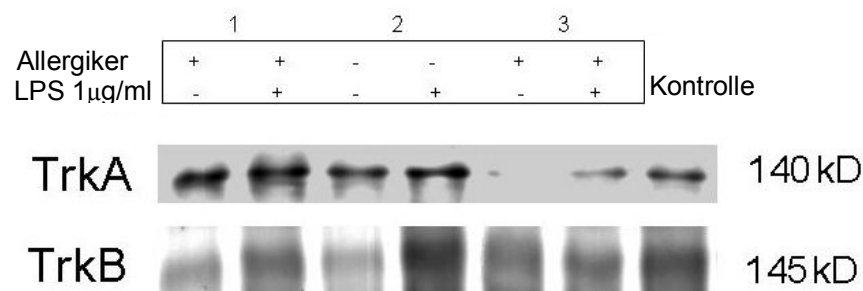
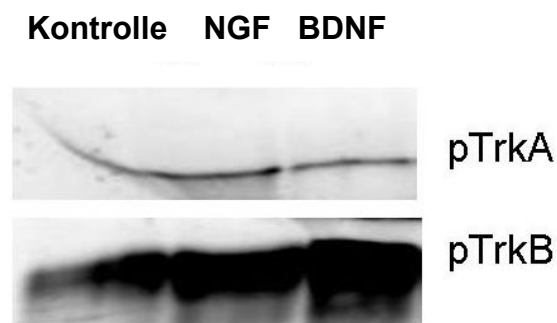


Abb. 11: TrkA und TrkB werden bei Allergikern durch LPS hochreguliert. Auch bei Nichtallergikern konnte sowohl TrkA als auch TrkB nachgewiesen werden. Auch hier bewirkte eine Stimulation mit LPS eine leichte Hochregulierung, was besonders deutlich bei TrkB zu sehen ist.

### 3.5 Trk Rezeptor-Phosphorylierung

Nach der Feststellung, dass Dendritische Zellen Neurotrophine und ihre hochaffinen spezifischen Rezeptoren exprimieren, ist es von Interesse herauszufinden, ob die Rezeptoren auch von den Neurotrophinen aktiviert werden. Da bekannt ist, dass die Trk-Rezeptoren durch Phosphorylierung aktiviert werden, ist dieser Assay geeignet für die Feststellung der Rezeptoraktivierung. Die Stimulation der MoDCs erfolgte vorab wie oben beschrieben durch die Neurotrophine NGF und BDNF sowie eine Kontrolle.

Nach Stimulation der MoDCs mit NGF und BDNF und darauffolgender Immunpräzipitation der Neurotrophinrezeptoren mit spezifischen p-TrkA oder anti p-Trk Antikörpern wurde eine SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Die größere Intensität der Banden im Bereich von TrkA und TrkB im Gegensatz zu den Negativkontrollen deutet darauf hin, dass eine Phosphorylierung stattgefunden hat.

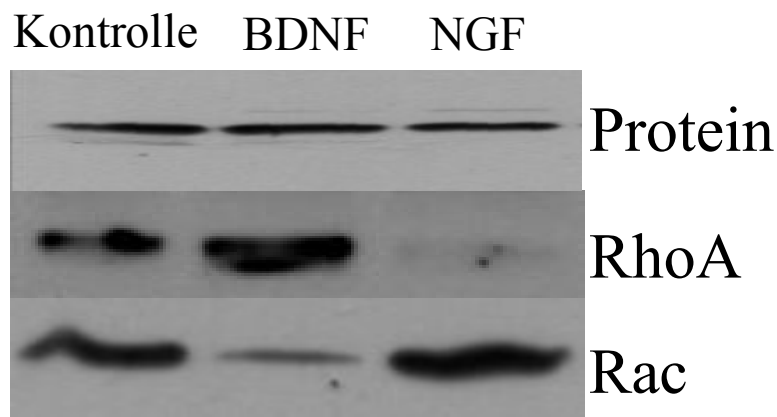


*Abb.12* Nach Immunpräzipitation zeigte sich bei der Gelelektrophorese stärkere Banden für TrkA sowie TrkB als bei der Kontrolle.

### 3.6 Rho und Rac pull down assay

Rho und Rac spielen eine maßgebliche Rolle in der Signaltransduktion Dendritischer Zellen. Damit werden wichtige Funktionen wie die Migration und Ausbildung von Dendriten gesteuert.

Hier wurden die Zellen ebenfalls zunächst mit NGF und BDNF stimuliert. Während BDNF RhoA hochregulierte und Rac herunterregulierte, wurde Rac durch Stimulation mit NGF deutlich stärker exprimiert als durch die BDNF-Stimulation. Die Untersuchung der Zelllysate mittels SDS-PAGE und Western Blot zeigte eine gleichmäßige Verteilung von NGF und BDNF.



*Abb.13:* RhoA wird durch BDNF hochreguliert durch NGF herunterreguliert. Rac wird durch NGF hochreguliert und durch BDNF herunterreguliert.

### 3.7 Ergebnisse der ELISA-Messungen

#### 3.7.1 Neurotrophinspeicherung und -freisetzung

Um zu untersuchen, ob Dendritische Zellen Neurotrophine speichern und ob diese Funktion durch Stimuli beeinflussbar ist, wurden die Zellen nach ihrer Reifung jeweils 24h und 48h mit 0,1µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml oder 1µl/ml Birken-pollenextrakt allein oder in Kombination mit 5µg/ml Polymyxin A stimuliert. Die Pro-ben wurden zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Zellpellets wurden mit Hilfe von Ultraschall lysiert. Die so gewonnenen Lysate und Überstände wurden nun mittels ELISA auf ihren Neurotrophingehalt hin untersucht. Es zeigte sich, dass durch Stimulation mit LPS sowie mit Allergenextrakt die BDNF-Speicherung signifikant erhöht war, während dieser Effekt bei NGF nicht signifikant zum Tragen kam. Im den Überständen zeigte sich darüber hinaus eine von LPS dosisabhängige Hochregulation von BDNF, wobei dessen Wert bei Allergenstimulation am höchsten war. Es schien keine Rolle zu spielen, ob die Probanden unter einer Allergie litten oder nicht, da auch die Dendritischen Zellen der Nichtallergiker BDNF ausschütten und auch diese Produktion durch Stimulation LPS und Allergenextrakt beeinflussbar war. Die Produktion und Speicherung von NGF wurde durch Stimulation nicht signifikant verändert.

Zelllysate

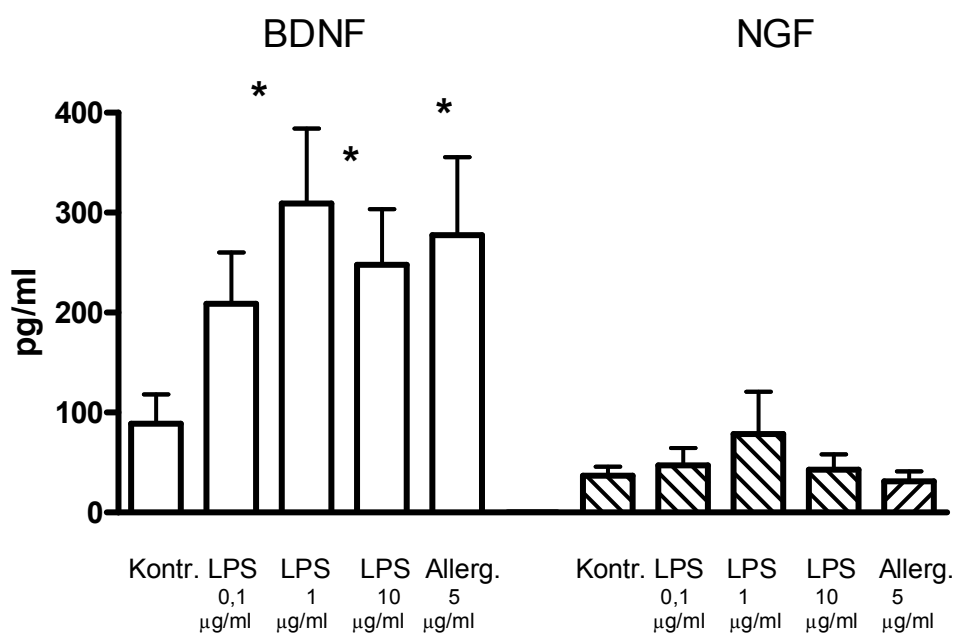


Abb. 14: Im Lysat wird BDNF durch Stimulation mit LPS und Allergen signifikant hochreguliert. Die Hochregulation zeigte sich nicht eindeutig dosisabhängig.

Zellkulturüberstand

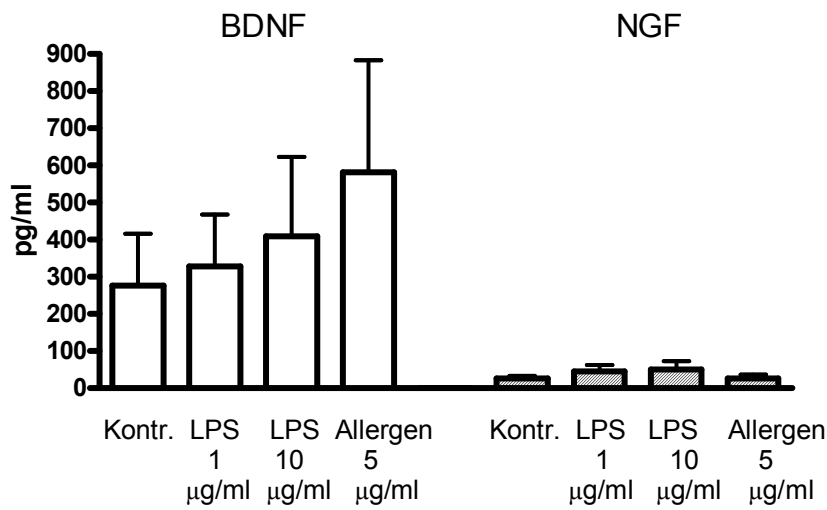


Abb. 15: BDNF wird durch LPS auch im Überstand signifikant hochreguliert, während die Produktion von NGF nicht signifikant beeinflussbar ist. Im Überstand ist der BDNF-Wert dosisabhängig von LPS und Allergen.



### 3.7.2 Freisetzung von Mediatoren durch Dendritische Zellen

Um eine Aktivierung der Neurotrophin-Rezeptoren nachzuweisen, wurden die MoDCs jeweils 24h mit NGF und BDNF stimuliert und daraufhin die Menge von IL-6, IL-4, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  mittels ELISA evaluiert.

Die Stimulation mit NGF und BDNF bewirkte eine signifikant erhöhte Ausschüttung von IL-6. P betrug bei NGF 0,0001 und bei BDNF 0,0019. Auch IL-10 war in mit NGF ( $p=0,012$ ) und BDNF ( $p=0,008$ ) stimulierten Zellkulturüberständen signifikant erhöht. Die Produktion von IL-4, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  wurde durch die Stimulation mit NGF und BDNF nicht signifikant beeinflusst. IL-12p70 befand sich bei der Mehrzahl der Proben unter der Nachweisgrenze.

Beide Neurotrophine riefen bei aus dem Blut allergischer Probanden generierter MoDCs eine erhöhte Ausschüttung von IL-6 hervor, während bei IL-10 der umgekehrte Fall eintraf: Hier wiesen die aus dem Blut gesunder Probanden generierte MoDCs eine erhöhte Ausschüttung auf.

	Kontrolle mit Medium			NGF 100 $\mu$ g/ml			BDNF 20 $\mu$ g/ml		
	Gesamt-kollektiv N=14	Allergiker N=9	Nicht-allergiker N=5	Gesamt-kollektiv N=14	Allergiker N=9	Nicht-allergiker N=5	Gesamt-kollektiv N=14	Allergiker N=9	Nicht-allergiker N=5
IL-6	<b>241<math>\pm</math>69.1</b>	291 $\pm$ 83.3	140 $\pm$ 38.2	<b>490<math>\pm</math>60.9**</b>	620 $\pm$ 14.9	231 $\pm$ 16.5	<b>544<math>\pm</math>55.5**</b>	642 $\pm$ 15.9	347 $\pm$ 18.3
IL-10	<b>137.7<math>\pm</math>38.6</b>	198 $\pm$ 48.9	43.4 $\pm$ 18.4	<b>377.9<math>\pm</math>39.9*</b>	296 $\pm$ 36.3	524.5 $\pm$ 37.9	<b>329<math>\pm</math>31.5*</b>	271 $\pm$ 33.5	435.5 $\pm$ 25.3
IL-4	<b>4247<math>\pm</math>1357</b>	4942 $\pm$ 1661	2857 $\pm$ 1580	<b>5175<math>\pm</math>250</b>	5152 $\pm$ 279	3692 $\pm$ 691	<b>4653<math>\pm</math>339</b>	4681 $\pm$ 377	2188 $\pm$ 187
TNF- $\alpha$	<b>80<math>\pm</math>16.4</b>	93 $\pm$ 25.8	62 $\pm$ 17	<b>102<math>\pm</math>10.5</b>	126 $\pm$ 5.3	69.7 $\pm$ 15.7	<b>98<math>\pm</math>10.5</b>	123 $\pm$ 8.7	65.1 $\pm$ 16
TGF- $\beta$	<b>1727<math>\pm</math>201.6</b>	2042 $\pm$ 244.1	1225 $\pm$ 217	<b>1754<math>\pm</math>188.8</b>	2462 $\pm$ 58.3	1371 $\pm$ 218	<b>2042<math>\pm</math>175.5</b>	2143 $\pm$ 143.6	1133 $\pm$ 251

Mittelwerte +SEM. Errechnet pro 10<sup>6</sup> Zellen \*:p<0.05; \*\*:p<0.01

Abb.16: Messung von Mediatoren in Zellkulturüberständen nach 24h Stimulation mit NGF oder BDNF (n=14)

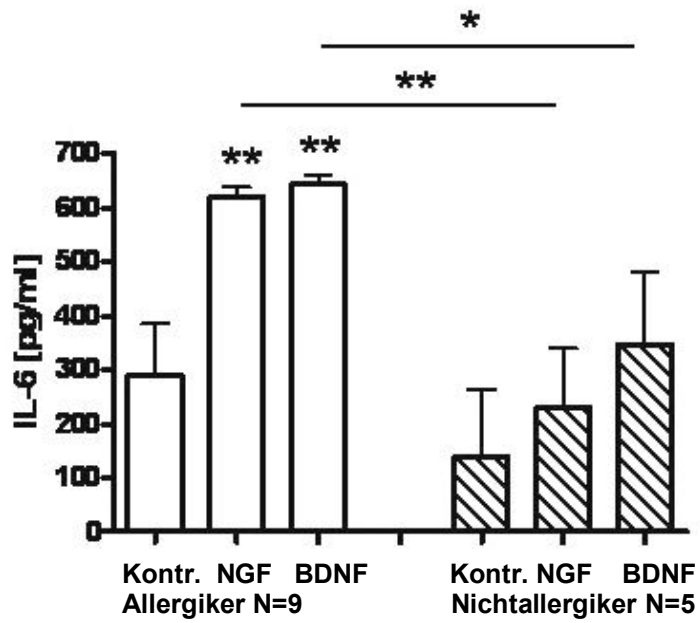


Abb. 17: IL-6 wird bei Allergien durch Stimulation mit den Neurotrophinen NGF und BDNF signifikant hochreguliert. Dieser Effekt war bei Allergikern signifikant stärker ausgeprägt als bei Nichtallergikern.

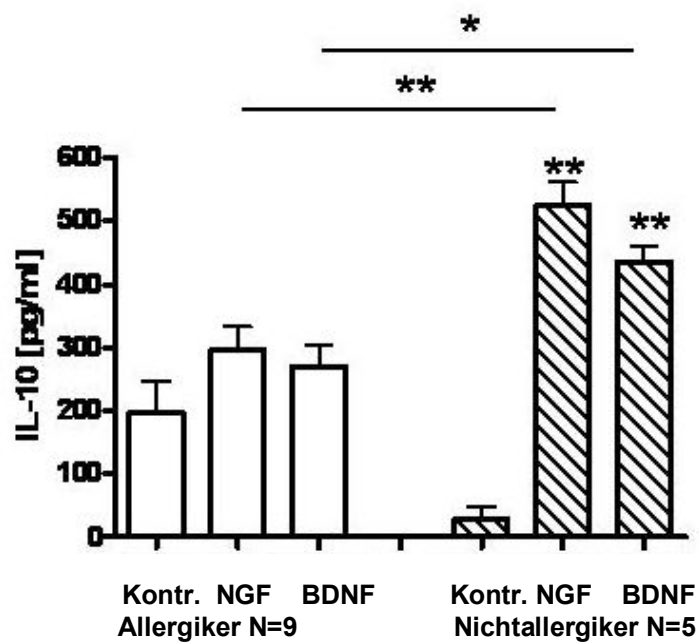


Abb. 18: IL-10 wird bei Nichtallergikern nach Stimulation mit Neurotrophinen signifikant erhöht ausgeschüttet. Bei Nichtallergikern zeigte sich dieser Effekt als nicht signifikant.

### **3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse**

- Humane Dendritische Zellen produzieren und speichern NGF und BDNF. Nach Stimulation mit LPS und Allergen ist BDNF signifikant erhöht.
- Auf mRNA-Ebene sind NGF und BDNF detektierbar. TrkB wird selektiv durch Stimulation mit LPS hochreguliert.
- Auf Proteinebene werden NGF und BDNF sowie TrkA und TrkB bei Allergikern durch Stimulation mit LPS hochreguliert.
- Eine Bindung der Rezeptoren TrkA und TrkB an ihre Liganden NGF und BDNF zieht eine Rezeptorphosphorylierung nach sich.
- Die Aktivität von RhoA wird durch Stimulation mit BDNF gesteigert, während sie durch NGF herabgesetzt wird. Im Gegensatz dazu aktiviert BDNF Rac, während Rho herunterreguliert wird.
- Stimulation mit NGF und BDNF bewirkt eine erhöhte Ausschüttung von Il-6 bei Dendritischen Zellen von Allergikern. Il-10 ist nach der Stimulation mit den beiden Neurotrophinen bei gesunden Probanden erhöht.
- Die flowzytometrische Untersuchung sowie die Immunfluoreszenz der MoDcs zeigte positive Ergebnisse für die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 sowie ihre spezifischen Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Bei den Neurotrophinen handelt es sich um Proteine, die eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen im menschlichen Körper ausüben. Zuerst wurde ihre Rolle im peripheren und zentralen Nervensystem aufgedeckt, dann wurden sie in diversen Immunzellen identifiziert. Auch bei verschiedenen Erkrankungen des Immunsystems und des Nervensystems wurde eine veränderte Neurotrophin-Expression gefunden. Nach segmentaler Allergenprovokation wurden sowohl in der BALF (*bronchioalveolar lavage fluid*) als auch in der NLF (*nasal lavage fluid*) erhöhte NGF-Spiegel nachgewiesen [94,97].

Dendritische Zellen spielen bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Als Antigenpräsentierende Zellen sind sie maßgeblich daran beteiligt, die Immunantwort auf in den Körper eingedrungene Antigene einzuleiten [125]. Es ist also größtenteils von ihnen abhängig, ob die Immunantwort überwiegend humoral oder zellulär ausfällt. Bis heute ist man sich nicht darüber im Klaren, was die Antigenpräsentierenden Zellen dazu veranlasst, bei manchen Menschen eine allergische Erkrankung begünstigende überwiegende TH2-Antwort im Körper zu provozieren. Hieraus ergibt sich die Frage, ob zwischen Dendritischen Zellen und der erhöhten Produktion von Neurotrophinen im Rahmen allergischer Erkrankungen ein Zusammenhang besteht. Zum einen ist es von Interesse herauszufinden, ob die Dendritischen Zellen an der Bildung von Neurotrophinen beteiligt sind, zum anderen ob und wie Dendritische Zellen auf Stimulation mit Neurotrophinen reagieren. Wichtig ist hier der Vergleich zwischen Allergikern und gesunden Kontrollpersonen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Maße aus peripherem Blut generierte Dendritische Zellen Neurotrophine produzieren und ob dies durch unspezifische und spezifische Stimuli regulierbar ist. Ferner wurde untersucht, ob die Produktion von bei allergischen Erkrankungen beteiligte Zytokine durch Stimulation mit Neurotrophinen regulierbar ist. Auch die Rezeptorphosphorylierung und die GTPasen RhoA und Rac wurden untersucht. Durch Zellkultur mit aus humanem Blut isolierten Monozyten wurden durch Priming mit GM-CSF und IL-4 unreife Dendritische Zellen generiert, ein von Sallusto und Lanzavecchia etabliertes Verfahren, mit dem zur Phagozytose be-

fähigte Dendritische Zellen generiert werden können [134]. Durch Zugabe spezifischer (Allergen) und unspezifischer (LPS) Stimuli in unterschiedlichen Dosen wurde die Freisetzung von Neurotrophinen kontrolliert. Mittels FACS wurde sichergestellt, dass es sich tatsächlich um Dendritische Zellen handelte. Ein Problem könnte darstellen, dass die auf diese Weise gewonnenen Dendritischen Zellen außerhalb ihrer natürlichen Umgebung gereift sind. Möglicherweise reagieren sie durch die veränderte Umwelt anders auf Stimuli als im menschlichen Körper, in dem sie durch eine Vielzahl an zusätzlichen Faktoren beeinflusst werden. Da es jedoch sehr aufwändig ist, Dendritische Zellen bzw. Langerhanszellen der Haut *ex vivo* zu isolieren, wurden diese lediglich für die Untersuchung der mRNA-Ebene verwendet.

Durch quantitative Analyse von NGF und BDNF in den aus MoDCs gewonnenen Ly-saten ist es gelungen zu zeigen, dass Dendritische Zellen als Produktionsquelle und Speicherort für Neurotrophine fungieren. Die Sekretion von BDNF war durch Zugabe von LPS und Allergen signifikant erhöht. Durch Stimulation mit verschiedenen Dosen LPS wurde BDNF in Lysat und Überstand dosisabhängig hochreguliert. NGF war nicht signifikant erhöht. Aus peripherem Blut isolierte Monozyten produzieren hingegen bei Allergikern signifikant mehr NGF als bei Nichtallergikern. Für BDNF konnten hier keine Unterschiede festgestellt werden [191]. Möglicherweise hängt die Produktion von Neurotrophinen bei Allergikern vom Reifegrad der Zellen ab. Im Laufe der Reifung scheinen die Monozyten ihre Fähigkeit, NGF zu produzieren, einzubüßen, dafür wird die Produktion von BDNF hochreguliert.

Auf mRNA-Ebene fanden sich erstmals positive Ergebnisse für die Neurotrophine NGF und BDNF sowie den Rezeptor TrkB. TrkB wurde erst nach Stimulation mit LPS oder CD40L nachweisbar. NGF und BDNF sowie TrkA und TrkB waren auf Proteinebene detektierbar. Hier bewirkte die Stimulation mit LPS eine selektive Hochregulation der Neurotrophine. Auf intakten Dendritischen Zellen waren sowohl die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 sowie die hochaffinen spezifischen Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC nachweisbar. Auf Proteinebene konnten bisher nur NGF und sein hochaffiner Rezeptor TrkA identifiziert werden [154]. Auf intakten Dendritischen Zellen wurden TrkA und NGF identifiziert [154]. Die Ergebnisse zeigen, dass die Neurotrophine einen Produktions- und Speicherort für die Neurotrophine NGF, BDNF

und NT-3 darstellen sowie die hochaffinen spezifischen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Um die Phosphorylierung der hochaffinen Rezeptoren TrkA und TrkB zu evaluieren, wurden die Zellen vorab kurzzeitig mit NGF und BDNF stimuliert, immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert. Es zeigten sich Banden sowohl im Bereich von p-TrkA als auch von p-TrkB. Allerdings war hier auch eine basale Phosphorylierung nachweisbar. Zum einen könnte dies an der Methode liegen, zum anderen ist es denkbar, dass Trk-Rezeptoren der Dendritischen Zellen durch einen autokrinen Effekt aktiviert werden. Die Stimulation der MoDCs mit NGF und BDNF bewirkte eine erhöhte Sekretion von IL-6 bei Allergikern, während bei Nichtallergikern IL-10 erhöht nachweisbar war. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl NGF als auch BDNF TrkA und TrkB binden und somit ihre Wirkungen auf Dendritische Zellen über die hochaffinen spezifischen Rezeptoren vermitteln. Dendritische Zellen stellen nicht nur eine Produktionsquelle für Neurotrophine dar, sondern sind auch in der Lage, auf die Neurotrophine NGF und BDNF zu reagieren. Dafür spricht zum einen die Anwesenheit der hochaffinen spezifischen Rezeptoren sowie deren Aktivierung nach Bindung an ihren Liganden, zum anderen die veränderte Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-10 als Antwort auf Stimulation mit NGF und BDNF.

Durch Dendritische Zellen produziertes IL-6 zieht durch eine Induktion des Transkriptionsfaktors c-Maf eine Erhöhung des IL-4 durch T-Zellen nach sich. IL-4 wiederum begünstigt die Entstehung von TH2-Zellen [192]. Bei Co-Kulturen von Dendritischen Zellen mit Zugabe von IL-6 kommt es zu einem TH2-Shift. Außerdem bewirkt IL-6 eine Herunterregulation von IL-12 und inhibiert damit eine Reifung von TH1-Zellen. Auf diese Weise verschiebt es das TH1/TH2-Gleichgewicht in Richtung TH2-Zelle [172]. IL-10 begünstigt die Bildung regulatorischer T-Zellen, fungiert also als antiinflammatorisches Zytokin [153,193]. Stimulation mit NGF und BDNF bewirkte bei Nichtallergikern eine Erhöhung von IL-10. In Anwesenheit von IL-10 werden vermehrt regulatorische T-Zellen gebildet und so eine Entzündung verhindert. Bei Allergikern hingegen wird als Antwort auf Stimulation mit NGF und BDNF vermehrt IL-6 gebildet, ein proinflammatorisches Zytokin, das möglicherweise die Entstehung von TH2-Zellen begünstigt. NGF und BDNF kommen somit in Frage, ein bei allergischen Erkrankungen entstehendes Ungleichgewicht des Immunsystems zu begünstigen.

### 4.1.2 Auswirkungen der Ergebnisse auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen

Die Dendritischen Zellen sind an der Pathogenese allergischer Erkrankungen beteiligt. Jene sind gekennzeichnet durch ein relatives Übergewicht der TH2-Antwort [149]. Als Antigenpräsentierende Zellen besitzen Dendritische Zellen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von T-Zellen. Somit entscheiden sie zum großen Teil, ob vermehrt TH1-oder TH2-Zellen gebildet werden. Sie sind vor allem in Geweben lokalisiert, die Kontakt zur Außenwelt haben und an denen somit eine hohe Antigenexposition stattfindet. Dendritische Zellen der Lunge erfahren bei allergischen Erkrankungen eine verfrühte Reifung, was zu einer unangemessenen Antigenpräsentation an naive T-Zellen vor Ort führt [147]. Die so differenzierten TH2-Zellen regen zum einen B-Zellen zur IgE-Produktion an, zum anderen bewirken sie eine durch Ausschüttung verschiedener Entzündungsmediatoren eine Aktivierung von Eosinophilen Granulozyten, die vor allem in der Spätphase des allergischen Asthmas bronchiale wirken. Auch die in anderen Geweben vorhandenen Dendritischen Zellen sind an dem TH2-Shift beteiligt. Warum bei allergischen Erkrankungen ein solcher TH2-Shift stattfindet und dadurch ein Ungleichgewicht zwischen TH1- und TH2-Zellen besteht, ist bisher weitgehend unklar. Einige Untersuchungen vermuten, dass das TH1/TH2-Gleichgewicht stark davon abhängig ist, wie viel IL-12 von den Dendritischen Zellen gebildet wird. Auch IL-4 und IL-13 tragen dazu bei, dass die Immunantwort von TH2-Zellen dominiert wird.

Diese Erklärungen sind bislang nicht ausreichend, um die Frage nach dem entscheidenden Schritt zwischen Antigenpräsentierender Zelle und TH2-Zelle bei allergischen Erkrankungen ausreichend zu klären. Die Neurotrophine BDNF und NGF tragen möglicherweise dazu bei, dass es zu dem TH2-Shift kommt. Bisherige Untersuchungen über Neurotrophine haben gezeigt, dass sie bei Allergikern sowohl im Serum als auch bei BAL-Untersuchungen nach segmentaler Allergenprovokation erhöht nachweisbar waren. Vor allem bei Asthmatikern lassen sich stark erhöhte Neurotrophin-Spiegel messen [41,97]. Die Produktion von NGF durch Eosinophile wird durch Behandlung mit Dexamethason deutlich herunterreguliert [100]. Sie sind sowohl in der allergischen Frühphase als auch in der allergischen Spätphase aktiv, können also die allergische Reaktion sowohl mit hervorrufen als auch unterhalten



[194]. Die Neurotrophine und ihre Rezeptoren werden von zahlreichen Zellen des Immunsystems sowie gewebständigen Zellen exprimiert, unter anderem von Eosinophilen, Lungengewebszellen, B- und T-Zellen Mastzellen sowie Fibroblasten und glatten Muskelzellen.

Dabei stellt sich die Frage, ob die erhöhte Neurotrophin-Produktion eine Antwort auf die bei Allergien bestehenden entzündlichen Vorgänge ist oder ob die Neurotrophine diese Vorgänge mit bedingen. Möglicherweise ist beides der Fall. Bei der Stimulation der Dendritischen Zellen mit NGF und BDNF wird bei Allergikern IL-6 und bei Nichtallergikern IL-10 signifikant hochreguliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Neurotrophine mit Zytokinen interagieren und dass sie bei Dendritischen Zellen ein verändertes Verhalten hinsichtlich der Produktion inflammatorischer Zytokine hervorrufen können. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass HMC-1 Zellen hochaffine Neurotrophinrezeptoren exprimieren und sie damit durch Neurotrophine beeinflusst werden können [61]. Ebenso Dendritische Zellen exprimieren die hochaffinen Rezeptoren TrkA, TrkB und TrkC wie diese und eine vorangegangene Untersuchung gezeigt haben [156]. Es ist also denkbar, dass Neurotrophine über die hochaffinen spezifischen Rezeptoren bei den Dendritischen Zellen von Allergikern eine TH2-Antwort induzieren können, da die Ergebnisse nahelegen, dass die Neurotrophine durch ihre auf Dendritischen Zellen exprimierten hochaffinen Rezeptoren Funktionen in den Zellen ausüben können. Dies kann zum einen die Hochregulation inflammatorischer, eine TH2-Antwort induzierender Zytokine sein, zum anderen ist es denkbar, dass die Neurotrophine auch direkt eine TH2-Antwort hervorrufen können. Da IL-6 in der Diskussion steht, einen Allergien begünstigenden TH2-Shift mit zu verursachen, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen Mechanismus hin, durch den die Neurotrophine allergische Erkrankungen begünstigen können. IL-10, das in erster Linie regulatorische Funktionen ausübt, wird bei Allergikern durch Stimulation mit NGF und BDNF herunterreguliert, während es bei Gesunden erhöht nachweisbar war. Bei den untersuchten Dendritischen Zellen handelt es sich um MoDCs, das heißt Dendritische Zellen, die aus deren Vorläufern, den Monozyten, generiert wurden. Diese Zellen sind also noch nicht mit Allergenen in Berührung gekommen. Trotzdem rufen NGF und BDNF bei den jeweiligen Probandengruppen unterschiedliche Immunantworten hervor, indem bei Allergikern das proinflammatorische Zytokin IL-6 erhöht

nachweisbar war und bei Nichtallergikern das regulatorische Zytokin IL-10. Dendritischen Zellen kommt bei Allergien eine wichtige Rolle hinsichtlich der Differenzierung naiver T-Zellen zu TH2-Zellen zu. Das alles deutet auf eine starke genetische Komponente bei der Entstehung allergischer Reaktionen hin, da Umweltbedingungen auf diese Zellen noch keinen Einfluss ausgeübt haben können. Durch die Kulturbedingungen erfolgte lediglich eine Stimulation mit GM-CSF und IL-4. Im menschlichen Körper gibt es eine Vielzahl an zusätzlichen Faktoren, die auf die Zelle einwirken und so eine Allergie hervorrufen. Diese Erkenntnis betrifft in erster Linie die Reaktion der Dendritischen Zellen auf die Neurotrophine. Was die Produktion neurotropher Faktoren anbelangt, konnte hier kein Unterschied zwischen allergischen und nicht allergischen Probanden ausgemacht werden.

Die Tatsache, dass NGF und BDNF einen Einfluss auf die Produktion inflammatorischer Zytokine nehmen, macht uns bewusst, dass sie eine zunehmend wichtige Rolle in der Entwicklung entzündlicher Erkrankungen spielen müssen. Die Ergebnisse der Zytokin-Messungen weisen auf ein relatives Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren bei der allergischen Entzündung hin. Es ist denkbar, dass dieses von Dendritischen Zellen, die vorab durch Neurotrophine geprimt wurden, mit verursacht wird. Bisher gibt es kaum Untersuchungen, ob Dendritische Zellen an der Neurotrophin-Produktion beteiligt sind, während dies für zahlreiche andere Zellen des Immun-systems bekannt ist. Da in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, dass Dendritische Zellen die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 exprimieren und darüber hinaus die Produktion von BDNF durch LPS dosisabhängig hochregulierbar ist, ist es denkbar, dass von Dendritischen Zellen produzierte Neurotrophine auch andere an der Allergieentstehung beteiligte Zellen beeinflusst. Durch autokrine und parakrine Mechanismen stimulieren die Dendritischen Zellen möglicherweise sich selbst oder andere Dendritische Zellen. Andere Zellen des Immun-systems, die an der Entstehung von Allergien beteiligt sind, wie beispielsweise Eosinophile, sind in der Lage, auf Neurotrophine zu reagieren. Eosinophile weisen als Antwort auf Stimulation mit NGF oder BDNF eine erhöhte Produktion von IL-4 und EPX auf [195].

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen NGF und BDNF als weitere an der erhöhten Proliferation von TH2-Zellen beteiligte Mediatoren im Zusammenhang mit allergischen

Erkrankungen zur Diskussion. Dabei stellte sich die Frage, wie die Wirkungsweise beziehungsweise welche spezifischen Funktionen der Dendritischen Zellen von NGF und BDNF beeinflusst werden. Im folgenden Kapitel werden zwei Mechanismen, durch welche die Neurotrophine in Dendritischen Zellen wirken, diskutiert.

### 4.1.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Migration und T-Zell-Interaktion

Die Ausbildung von Dendriten und die Migration sind zum großen Teil verantwortlich für die Funktion der Dendritischen Zellen wie Antigenaufnahme und –prozessierung und somit essentiell für die Stimulation von T-Zellen. Hierfür werden verschiedene Signaltransduktionsmechanismen benötigt wie beispielsweise die kleinen GTPasen Rho/Rac und Cdc40. Es handelt sich hierbei um G-Proteine, die zwischen einem inaktiven GDP gebundenen und einem aktiven GTP gebundenen Stadium hin und her pendeln. Sie erfüllen wichtige Aufgaben in der Gen-Transkription, Zellzyklus und Zelladhäsion sowie in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Besonders die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts ist notwendig für die Ausbildung der Dendriten. Cdc42 und Rac1 scheinen hier mehr die Migration durch Zellextension und Ausbildung von Dendriten zu steuern, während Rho eher für die Zelladhäsion und der damit verbundenen Zellkontraktion verantwortlich zu sein scheint. Auch die Formierung der Dendriten wird vor allem der Aktivität von Rho zugeschrieben. Da die Dendriten hauptsächlich für die Interaktion mit T-Zellen und damit der Aktivierung der spezifischen Immunabwehr verantwortlich sind, kommt diesem Signaltransduktionsmolekül eine wichtige Aufgabe bei der Entscheidung zu, welcher Weg eingeschlagen werden soll, ob die Immunantwort von TH1- oder von TH2-Zellen dominiert wird. [162,163]. Die Untersuchung der Rezeptorphosphorylierung hat gezeigt, dass die hochaffinen spezifischen Rezeptoren TrkA und TrkB durch die Neurotrophine NGF und BDNF aktiviert werden. In diesen Untersuchungen war es erstmals möglich, durch Messung der GTPasen Rac und Rho zu zeigen, wie zwei der wichtigsten Signaltransduktionsmechanismen, die für die Funktion von Dendritischen Zellen essentiell sind, durch NGF und BDNF unterschiedlich reguliert werden. Es konnten gegensätzliche Effekte der Stimulation im Hinblick auf die Rho- und Rac-Aktivität beobachtet werden. Während BDNF RhoA hochregulierte und Rac herunterregulierte, wurde

Rac durch Stimulation mit NGF deutlich stärker exprimiert als durch die BDNF-Stimulation. Bei dieser Beobachtung muss es sich um einen Effekt handeln, der durch die spezifischen hochaffinen Rezeptoren TrkA und TrkB vermittelt wird, da p75 alle Neurotrophine mit niedriger Affinität bindet.

Beide Neurotrophine scheinen auf unterschiedliche Art und Weise die Ausbildung von Dendriten und damit die essentiellen Funktionen Dendritischer Zellen zu kontrollieren. Demnach könnte BDNF an der Zelladhäsion und der Formierung dendritischer Prozesse von DCs beteiligt sein. Da die Dendriten eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen und damit in der Art und Weise der Immunantwort spielen, könnte BDNF einer der entscheidenden Faktoren bei der Bestimmung des TH1/TH2-Zellgleichgewichts darstellen. Auch die verfrühte Reifung Dendritischer Zellen in der Lunge bei einem Asthma-Mausmodell mit Hochregulation verschiedener kostimulatorischer Moleküle für die T-Zell-Interaktion [147] könnte durch BDNF mit verursacht werden, da dieses Protein bei BAL-Untersuchungen bei Allergikern erhöht nachweisbar war. Außerdem wird Rac von BDNF inhibiert und so möglicherweise die Wanderung zu den Lymphknoten verhindert, was letzten Endes dazu führt, dass die Dendritischen Zellen in der Lunge persistieren.

Rac hingegen, das vor allem die Migration Dendritischer Zellen reguliert, wird von NGF hochreguliert und von BDNF herunterreguliert. Das wirft die Frage auf, ob NGF für die Migration Dendritischer Zellen mitverantwortlich ist. Die Wanderung Dendritischer Zellen zu regionalen Lymphknoten scheint also von NGF signifikant beeinflusst zu werden, indem NGF die Mobilität fördert.

In einer anderen Untersuchung führte eine Inhibition von Rho bei DCs zu einer verminderten Bildung von Dendriten. Mit dieser Methode wird eine entscheidende Funktion der Dendritischen Zellen und damit die T-Zellinteraktion blockiert [196]. Bei der Untersuchung einer Phäochromozytomzelllinie von Ratten zeigte sich nach der Phosphorylierung von TrkA durch NGF zu einer Stimulation von Pi3K, was dann zu einer erhöhten Aktivität von Rac1 und einer Inaktivierung von RhoA führt [197]. Bei einer Untersuchung über die Migration von Schwann'schen Zellen wurde die Beobachtung gemacht, dass BDNF RhoA und damit die Migration der Zellen inhibiert. Also scheint bei Schwann'schen Zellen vor allem RhoA für die Migration verantwortlich zu sein [198].

Im Stimulationsassay wurde BDNF durch LPS und Allergen dosisabhängig hochreguliert. Daraus lässt sich schließen, dass Dendritische Zellen auf eine starke Stimulation mit einer vermehrten Formation von Dendriten reagieren, was sie zur besseren Antigenaufnahme und T-Zell-Aktivierung befähigt. Sowohl NGF als auch BDNF rufen bei DCs von Allergikern eine erhöhte Ausschüttung von IL-6 und eine verminderte Ausschüttung von IL-10 hervor. Die Betrachtung dieser Ergebnisse im Kontext mit den durch NGF und BDNF signifikant veränderten Signaltransduktionsmechanismen gibt Anlass zur Diskussion, ob zwischen diesen Mechanismen ein Zusammenhang besteht. IL-6 steht im Verdacht, eine TH2-Antwort zu verursachen, ein Vorgang, der abhängig von der Ausbildung von Dendriten und somit von der Aktivierung von Rho ist. IL-10 verursacht eine erhöhte Bildung regulatorischer T-Zellen. Die Vermutung liegt nahe, dass die durch NGF und BDNF in Gang gesetzten Signaltransduktionsmechanismen die veränderte Expression dieser Zytokine hervorrufen. Auf diesem Gebiet wäre es von großem Interesse, das Augenmerk auf kostimulatorische Moleküle für die T-Zellaktivierung zu richten.

### **4.2 Dendritische Zellen, Neurotrophine und die neurogene Entzündung**

Es ist mittlerweile unumstritten, dass Immunsystem und Nervensystem keine voneinander getrennten Systeme sind, sondern dass sie miteinander agieren und sich gegenseitig beeinflussen. Die Pathogenese des Asthmas bronchiale zeigt eindrücklich, dass zwischen den beiden Systemen ein Zusammenhang besteht. Trotzdem gibt es bislang hierfür lediglich Erklärungsansätze.

Zwei der Hauptsymptome des allergischen Asthmas sind eine allergengetriggerte bronchiale Obstruktion, die als Sofortreaktion oder noch nach Tagen als allergische Spätreaktion auftreten kann, und eine Hyperreagibilität der Bronchien, die durch einen unspezifischen Stimulus ausgelöst wird [1]. Diese Symptome sind nach gängiger Lehrmeinung postinflammatorische Veränderungen, die zum großen Teil zur Chronifizierung des Leidens beitragen. Bei der Entwicklung dieser für das allergische Asthma charakteristischen Merkmale spielen vagale cholinerge sowie sensorische Innervation eine große Rolle, da eine allergische Entzündung auch Veränderungen im pulmonalen Nervensystem zur Folge hat. Diese Veränderungen beinhalten sensori-

sche Hyperreagibilität, eine verstärkte Signaltransduktion in parasympathischen Ganglien und sogar einen stärkeren zentralen Reflex im Hirnstamm [199]. Das Symptom der Hyperreagibilität ist bislang nur unzureichend geklärt worden. Zum einen sind Entzündungsmediatoren wie Histamin und Leukotriene an der Entwicklung der Hyperreagibilität beteiligt. Zum anderen sind Stoffe wie Metacholin, das über muskarinerge Rezeptoren direkt auf die glatte Muskulatur der Bronchien wirkt, involviert [200]. Capsaicin, eine aus scharfen Peperoni isolierte Substanz, bewirkt bei sensorischen C-Fasern eine Ausschüttung der Neuropeptide Substanz P, NKA (Neurokinin A) und CGRP (*calcitonin gene related peptide*) [201]. Neuropeptide wie Substanz P werden bei allergischen Atemwegserkrankungen vermehrt produziert und ausgeschüttet. Sie bedingen zum Teil die entzündlichen Begleiterscheinungen wie Bronchiokonstriktion, Hyperreagibilität und Gefäßdilataion [103]. Darüber hinaus üben sie positiven Einfluss auf die Histaminsekretion von Mastzellen der Lunge aus [104]. Einige Zellen der Haut wie Langerhanszellen, Keratinozyten, Mastzellen und Fibroblasten werden von Neurotransmittern aus Nervenzellen der Haut aktiviert [105]. In einem experimentellen Asthma-Modell beim Meerschweinchen führt eine allergische Entzündung zu sensorischer Hyperreagibilität und einer Hochregulation von Tachykininen in pulmonalen sensorischen Nervenfasern [202].

Bei der zur Familie der Tachykinie gehörenden Substanz P handelt es sich nicht nur um einen Neurotransmitter wie ursprünglich angenommen wurde. Auch Zellen des Immunsystems so wie Dendritische Zellen, Makrophagen, Eosinophile und Lymphozyten wurden als Produktionsquelle für das Neuropeptid beschrieben [203-205]. Substanz P wurde bei BAL-Untersuchungen und im Sputum bei Patienten, die an allergischem Asthma bronchiale litten, erhöht nachgewiesen [206]. Die Neurokinin-Rezeptoren NK-1R und NK-2R sind in verschiedenen Gewebstypen der Lunge nachweisbar, beispielsweise auf glatten Muskelzellen und Gefäßen. Die Nervenfasern des Bronchialepitheliums enthalten zum größten Teil Substanz P. Auf diese Weise können die Tachykinine die Bronchiokonstriktion beim Asthma hervorrufen. Substanz P hat einen Einfluss auf zahlreiche Zellen des Immunsystems. Bei Monozyten und Makrophagen hat es eine chemotaktische Wirkung und kann darüber hinaus diese Zellen zu einer Sekretion von Zytokinen wie IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 anregen. Bei peritonealen Makrophagen von Meerschweinchen induziert es die Bildung PGE<sub>2</sub>,

Thromboxan B<sub>2</sub>, toxischen Sauerstoffradikalen und Arachnoidon-säuremetaboliten. Außerdem steigert es bei Makrophagen die Phagozytose. Aus Sputum gewonnene Makrophagen und periphere Monozyten exprimieren Substanz P und NK-1R, was darauf hindeutet, dass Tachykinine bei entzündlichen Erkrankungen der Atemwege eine Rolle spielen könnten [207,208]. Die Tachykinine sind also sowohl direkt an der bronchialen Hyperreagibilität beteiligt, als auch an der Einwanderung von Entzündungszellen und der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren.

So liefern die Tachykinine einen Erklärungsansatz für die Entstehung der neurogenen Entzündung beim allergischen Asthma bronchiale. Ein weiteres Puzzleteil könnten die Neurotrophine darstellen, eine weitere Gruppe von Substanzen, die sowohl nervale Prozesse steuern als auch in immunologische sowie entzündliche Prozesse involviert sind. Tachykinine und Neurotrophine ähneln sich somit in ihrem Einfluss auf die Pathogenese des allergischen Asthmas, sie bedingen sich sogar gegenseitig. Man ist sich heute einig, dass NGF an der Entwicklung und am Überleben zentraler und peripherer Neuronen beteiligt ist und dass sowohl sensorische als auch sympathische Nervenfasern NGF und TrkA exprimieren. Auch weiß man, dass NGF in sensorischen Neuronen die Produktion von Tachykininen wie Substanz P und CGRP fördert [21,209]. Transgene Mäuse, die in Klarazellen der Lungen eine Überexpression von NGF aufweisen, entwickeln eine Hyperinnervation der Lunge mit tachykininhaltigen sensorischen und sympathischen Nervenfasern [110,209]. Eine lokale Injektion von NGF in die Tracheawand von Meerschweinchen führt zu strukturellen Veränderungen der sensiblen Innervierung der Tracheawand mit einem Anstieg an Substanz P-positiven Neuronen [210].

Die entzündlichen Begleiterscheinungen wie Obstruktion und Hyperreagibilität beim allergischen Asthma, die durch Substanzen wie die Tachykinine und Neurotrophine mit bedingt werden, sind charakteristisch für die allergische Spätphasenreaktion. Zu den Zellen, die hier eine große Rolle spielen, gehören vor allem Eosinophile, die durch Produktion von Schleim, Enzymen und Zytokinen die Entzündung unterhalten und den Gewebsumbau mit bedingen. Daraus ergibt sich die Frage, inwieweit die Dendritischen Zellen bei der neurogenen Entzündung beteiligt sein können, sind sie doch Zellen, die in der Pathogenese des allergischen Asthmas ganz am Anfang stehen und vor allem an der Bildung von TH<sub>2</sub>-Zellen mitwirken. Zahlreiche vorangegan-

gene Untersuchungen haben gezeigt, dass neurotrophe Faktoren von vielen verschiedenen Zellen exprimiert werden, zunächst fand man sie auf peripheren, dann auf zentralen Neuronen und schließlich auf verschiedenen Zellen des Immunsystems wie B- und T-Zellen, Mastzellen, Monozyten und Eosinophilen. Auch sind hier einige Wirkungen bekannt, die sie auf Zellen ausüben. Beispielsweise bewirken sie bei Mastzellen eine Degranulation und bei Eosinophilen eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren beim allergischen Asthma bronchiale. Es ist also denkbar, dass die Produktion von Neurotrophinen durch Dendritische Zellen einen weiteren Erklärungsansatz für die Entwicklung des allergischen Asthmas liefert, dass neurotrophe Faktoren sowohl direkt oder in Interaktion mit Substanzen wie den Tachykinen eine neuronale Veränderung in den oberen Atemwegen hervorrufen oder indirekt durch Erhöhung proinflammatorischer Zytokine und Rekrutierung von Zellen, die eine allergische Entzündung begünstigen wie etwa Mastzellen, Eosinophile oder TH2-Zellen.

### **4.3 Bedeutung der Ergebnisse für die Hygiene-Hypothese**

Oft beginnen Symptome von Allergie und/oder Asthma bereits im Kindesalter. Für die Mechanismen der Entstehung von Erkrankungen des atopischen Formenkreises gibt es bis heute lediglich Erklärungsansätze. Viele verschiedene Faktoren tragen zur Entwicklung der Krankheit bei. Ein wichtiger Faktor ist die genetische Disposition, die viele Menschen haben. Für die Entstehung einer manifesten Allergie müssen aber noch bestimmte Umweltfaktoren wie Ernährung, Allergenexposition, Schadstoffe der Luft, frühkindliche Infekte und soziale Faktoren hinzukommen. Inwieweit diese einen Einfluss auf die Entstehung der Krankheit ausüben, wird derzeit kontrovers diskutiert. Die Hygienehypothese besagt, dass eine hohe Exposition mikrobieller Substanzen in der Kindheit das Immunsystem so in Anspruch nimmt, dass Allergien gar nicht erst entstehen können, bzw. dass eine übertriebene Hygiene ein Allergien begünstigendes zelluläres Ungleichgewicht fördert. Zu diesem Thema existiert eine Vielzahl epidemiologischer Studien. In den neuen Bundesländern ist die Allergierate deutlich niedriger als in Westdeutschland, was zum Teil darauf zurückgeführt wird, dass die Kinder schon sehr früh Betreuungseinrichtungen besuchten, wodurch das Immunsys-



tem durch Exposition diverser bakterieller und viraler Krankheitserreger stärker beansprucht wurde als bei Kindern, die zu Hause aufwuchsen [211,212].

Die Prävalenz atopischer Erkrankungen ist in Ländern der Dritten Welt signifikant niedriger als in den Industrienationen, was darauf zurückgeführt wird, dass in diesen Ländern die Erkrankungsrate viraler, bakterieller und parasitärer Erreger höher ist als in industrialisierten Ländern [213].

Virale Erkrankungen verursachen eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$ , ein Zytokin, das im Verdacht steht, die IgE-Synthese zu hemmen und so eine protektive Wirkung hinsichtlich der Entstehung von Allergien auszuüben [213].

In den letzten Jahren sind jedoch Studien durchgeführt worden, die an der Hygiene-Hypothese wenigstens teilweise zweifeln lassen. In erster Linie betrifft dies die viralen Erkrankungen. RSV (*respiratory syncytial virus*), ein Virus, der eine der häufigsten Ursachen für Bronchiolitis und Pneumonie bei Kindern unter einem Jahr darstellt, erhöht nach neueren Erkenntnissen das Risiko für die Entstehung von Asthma bronchiale. Dies betrifft vor allem die Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität [214]. Dieser Zusammenhang ist trotz zahlreicher Studien auf diesem Gebiet bisher nur unzureichend geklärt worden. Zum einen könnte eine durch RSV supprimierte Produktion von IFN- $\gamma$  und eine Erhöhung von Th2-Zytokinen beteiligt sein [215]. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, das Augenmerk auf die Neurotrophine zu richten, da bei Allergien eine erhöhte Produktion von NGF und BDNF nachweisbar ist [94]. Bei der Untersuchung der NGF-Werte von Kindern, die an einer RSV-Infektion erkrankt waren, fand man vergleichbare Werte wie bei an allergischem Asthma erkrankten Personen. BDNF wurde hier ebenfalls signifikant erhöht nachgewiesen [216]. Eine Studie an Ratten hat gezeigt, dass während einer RSV-Infektion die Expression von NGF, TrkA und p75 sowie Rezeptoren für Substanz P und Neurokinin A hochreguliert wurde. Die Verabreichung von anti-NGF führte zu einer Verhinderung der NK1-Rezeptor-Expression und der neurogenen Entzündung [83]. RSV-Erkrankungen in früher Kindheit führen zu einem erhöhten Risiko der Entwicklung von Asthma bronchiale noch im Kindesalter [217]. Da die Infektion mit RSV eine häufige Erkrankung im frühen Kindesalter darstellt, entsteht die neurogene Inflammation beim Asthma bronchiale möglicherweise auf deren Boden und wird mit hervorgerufen durch die erhöhte Expression von Neurotrophinen.

#### 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine mögliche Beteiligung der von Dendritischen Zellen produzierten Neurotrophine NGF und BDNF an der Pathogenese allergischer Erkrankungen. Die Produktion von BDNF durch LPS und Allergen ist signifikant regulierbar und NGF ist bei Allergikern erhöht nachweisbar, jedoch ist letztes Ergebnis nicht von statistischer Signifikanz. Die Dendritischen Zellen fungieren nicht nur als Quelle für NGF und BDNF, sie sind auch durch die beiden Neurotrophine beeinflussbar, was ihre Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-10 als Antwort auf die Stimulation mit NGF und BDNF zeigt. Diese Ergebnisse stellen einen neuen Pathogeneseweg der bei Allergien vermehrten Proliferation von TH2-Zellen zur Diskussion.

Bislang ist keine Therapie etabliert, die allergische Erkrankungen hinreichend behandelt. Ansätze dazu sind bereits vorhanden. Beispielsweise wäre es denkbar, durch die spezifische Blockierung proinflammatorischer am bei Allergien bestehenden zellulären Ungleichgewicht beteiligter Zytokine eine allergische Reaktion von Anfang an zu unterbinden.

Neue zielgerichtete Strategien bei der Behandlung des allergischen Asthmas wie beispielsweise die Inhibition von IL-5 zeigten nur mäßige Erfolge bei der Bekämpfung der eosinophilen Entzündung der Atemwege. Die periphere Eosinophilie wurde zwar verringert, jedoch blieben die eosinophile Entzündung der Atemwege, bronchiale Hyperreagibilität sowie die für die Spätphasenreaktion charakteristische Obstruktion nahezu unbeeinflusst [218]. Die Neurotrophine sind nach jüngeren Studien vor allem in der allergischen Spätphase aktiv, in der sie eine eosinophile Infiltration und bronchiale Hyperreagibilität begünstigen. Jedoch lassen die Untersuchungen dieser Arbeit an Dendritischen Zellen vermuten, dass sie auch an der Entstehung allergischer Reaktionen beteiligt sind. Bei Ratten, bei denen man vorab ein Asthma bronchiale induzierte, bewirkte die Gabe von anti-NGF vor allem eine herabgesetzte Intensität der allergischen Frühphase [219]. Dies unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, die Neurotrophine in Dendritischen Zellen nachweisen. So wäre es denkbar, durch Gabe eines spezifischen gegen Neurotrophine gerichteten Antikörpers die Entstehung von Allergien zu verhindern. Auch die bronchiale Hyperreagibilität beim allergischen Asthma bronchiale, die durch die Neurotrophine mit bedingt wird, könnte dadurch

beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang sind auch Ansätze vorhanden, durch Blockierung der Tachykinin-Rezeptoren NK1, NK2 und NK3 die das chronische Asthma begleitende Bronchiokonstriktion zu beeinflussen [220]. Die das Asthma bronchiale begünstigende Erkrankung mit RSV wirkt möglicherweise durch eine Hochregulation von Neurotrophinen in der Lunge und führt so zur bronchialen Hyperreagibilität. Dieser Mechanismus könnte somit durch die Gabe von Antikörpern gegen Neurotrophine noch während der Infektion unterbunden werden. Die Neurotrophine NGF und BDNF werden bei Allergikern und Nichtallergikern unterschiedlich reguliert. Möglicherweise trägt dieses Ungleichgewicht zur Entstehung von Allergien bei. Offensichtlich werden aber beide Faktoren durch Allergenprovokation hochreguliert. Um die genauen Mechanismen herauszufinden, müssen weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet durchgeführt werden.

Ob die Blockierung von NGF und/oder BDNF im menschlichen Körper in Zukunft eine therapeutische Möglichkeit zur Verhinderung einer allergischen Reaktion darstellen könnte, muss weitere Forschung auf diesem Gebiet zeigen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Busse WW, Lemanske RF, Jr.: Asthma. *N Engl J Med* 2001;344:350-362.
2. Kaiser HB: Risk factors in allergy/asthma. *Allergy Asthma Proc* 2004;25:7-10.
3. Hogg JC: Childhood viral infection and the pathogenesis of asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:S26-28.
4. Martinez FD: Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:S76-82.
5. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K: Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 2002;196:1645-1651.
6. Robinson D, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR: Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92:313-324.
7. Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA: Cytokine messenger RNA expression for IL-3, IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor in the nasal mucosa after local allergen provocation: relationship to tissue eosinophilia. *J Immunol* 1992;148:2390-2394.
8. Canonica GW: Introduction to nasal and pulmonary allergy cascade. *Allergy* 2002;57 Suppl 75:8-12.
9. 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.
10. Aloe L: Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology. *Trends Cell Biol* 2004;14:395-399.
11. Gotz R, Koster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, Thoenen H: Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* 1994;372:266-269.
12. Lai KO, Fu WY, Ip FC, Ip NY: Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 1998;11:64-76.
13. Lewin GR, Barde YA: Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:289-317.
14. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A: Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokinin. *Trends Neurosci* 1996;19:514-520.
15. Ryden M, Ibanez CF: A second determinant of binding to the p75 neurotrophin receptor revealed by alanine-scanning mutagenesis of a conserved loop in nerve growth factor. *J Biol Chem* 1997;272:33085-33091.
16. Levi-Montalcini R: The nerve growth factor 35 years later. *Science* 1987;237:1154-1162.
17. Fahnstock M: Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991;165:1-26.
18. Lindsay RM, Wiegand SJ, Altar CA, DiStefano PS: Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* 1994;17:182-190.
19. Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, Rossi G, Bernardi N, Cattaneo A: Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic

- mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci* 2000;20:2589-2601.
20. Crowley C, Spencer SD, Nishimura MC, Chen KS, Pitts-Meek S, Armanini MP, Ling LH, McMahon SB, Shelton DL, Levinson AD, et al.: Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell* 1994;76:1001-1011.
  21. Lindsay RM, Harmar AJ: Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. *Nature* 1989;337:362-364.
  22. Lindsay RM: Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci* 1988;8:2394-2405.
  23. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M, Chao M: Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 1986;47:545-554.
  24. Goedert M, Otten U, Hunt SP, Bond A, Chapman D, Schlumpf M, Lichtensteiger W: Biochemical and anatomical effects of antibodies against nerve growth factor on developing rat sensory ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1580-1584.
  25. Michael GJ, Averill S, Nitkunan A, Rattray M, Bennett DL, Yan Q, Priestley JV: Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci* 1997;17:8476-8490.
  26. Barde YA, Edgar D, Thoenen H: Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J* 1982;1:549-553.
  27. Alsina B, Vu T, Cohen-Cory S: Visualizing synapse formation in arborizing optic axons in vivo: dynamics and modulation by BDNF. *Nat Neurosci* 2001;4:1093-1101.
  28. Korte M, Bonhoeffer T: Activity-dependent synaptic plasticity: a new face of action for neurotrophins. *Mol Psychiatry* 1997;2:197-199.
  29. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y: BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005;438:1017-1021.
  30. Kang H, Welcher AA, Shelton D, Schuman EM: Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 1997;19:653-664.
  31. Malcangio M, Lessmann V: A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:116-121.
  32. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J, Shelton DB, McMahon SB, Thompson SW: Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1999;19:5138-5148.
  33. Thompson SW, Bennett DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahon SB: Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7714-7718.
  34. Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, Koga K, Furue H, Yasaka T, Nakatsuka T, Zhou XF, Kawasaki Y, Tanaka N, Yoshimura M: Actions of brain-derived neurotrophic factor on spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat. *J Physiol* 2005;569:685-695.
  35. DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, Lindsay RM, Wiegand SJ: The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct

- patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 1992;8:983-993.
36. Yan Q, Elliott JL, Matheson C, Sun J, Zhang L, Mu X, Rex KL, Snider WD: Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol* 1993;24:1555-1577.
  37. Metsis M: Genes for neurotrophic factors and their receptors: structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1014-1020.
  38. Stephens HE, Bellow AC, Gupta JS, Mirkovic S, Kablar B: The role of neurotrophins in the maintenance of the spinal cord motor neurons and the dorsal root ganglia proprioceptive sensory neurons. *Int J Dev Neurosci* 2005;23:613-620.
  39. Kang H, Schuman EM: Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 1995;267:1658-1662.
  40. Huang EJ, Reichardt LF: Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-642.
  41. Frossard N, Freund V, Advenier C: Nerve growth factor and its receptors in asthma and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;500:453-465.
  42. Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M: A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 1986;319:743-748.
  43. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A: Update of the NGF saga. *J Neurol Sci* 1995;130:119-127.
  44. Muragaki Y, Timothy N, Leight S, Hempstead BL, Chao MV, Trojanowski JQ, Lee VM: Expression of trk receptors in the developing and adult human central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* 1995;356:387-397.
  45. Thoenen H: Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 1995;270:593-598.
  46. Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M: trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *Embo J* 1989;8:3701-3709.
  47. Wiedemann FR, Siemen D, Mawrin C, Horn TF, Dietzmann K: The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. *Int J Biochem Cell Biol* 2005.
  48. Lamballe F, Klein R, Barbacid M: The trk family of oncogenes and neurotrophin receptors. *Princess Takamatsu Symp* 1991;22:153-170.
  49. Castellanos DA, Tsoulfas P, Frydel BR, Gajavelli S, Bes JC, Sagen J: TrkC overexpression enhances survival and migration of neural stem cell transplants in the rat spinal cord. *Cell Transplant* 2002;11:297-307.
  50. Kahn MA, Kumar S, Liebl D, Chang R, Parada LF, De Vellis J: Mice lacking NT-3, and its receptor TrkC, exhibit profound deficiencies in CNS glial cells. *Glia* 1999;26:153-165.
  51. Huebner K, Isobe M, Chao M, Bothwell M, Ross AH, Finan J, Hoxie JA, Sehgal A, Buck CR, Lanahan A, et al.: The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:1403-1407.
  52. Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM: p75<sup>NTR</sup>--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 2005;15:49-57.
  53. Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM: Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* 1999;290:149-159.

54. Wiesmann C, Ultsch MH, Bass SH, de Vos AM: Crystal structure of nerve growth factor in complex with the ligand-binding domain of the TrkA receptor. *Nature* 1999;401:184-188.
55. Kaplan DR, Miller FD: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000;10:381-391.
56. Dechant G: Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell Tissue Res* 2001;305:229-238.
57. Vega JA, Garcia-Suarez O, Germana A: Vertebrate thymus and the neurotrophin system. *Int Rev Cytol* 2004;237:155-204.
58. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U: Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10984-10988.
59. Coppola V, Barrick CA, Southon EA, Celeste A, Wang K, Chen B, Haddad el B, Yin J, Nussenzweig A, Subramaniam A, Tessarollo L: Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 2004;131:5185-5195.
60. D'Onofrio M, de Grazia U, Morrone S, Cuomo L, Spinsanti P, Frati L, Gulino A, Ragona G: Expression of neurotrophin receptors in normal and malignant B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:283-291.
61. Tam SY, Tsai M, Yamaguchi M, Yano K, Butterfield JH, Galli SJ: Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 1997;90:1807-1820.
62. Ehrhard PB, Ganter U, Stalder A, Bauer J, Otten U: Expression of functional trk protooncogene in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5423-5427.
63. Otten U, Scully JL, Ehrhard PB, Gadiant RA: Neurotrophins: signals between the nervous and immune systems. *Prog Brain Res* 1994;103:293-305.
64. Micera A, Vigneti E, Pickholtz D, Reich R, Pappo O, Bonini S, Maquart FX, Aloe L, Levi-Schaffer F: Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6162-6167.
65. Hikawa S, Kobayashi H, Hikawa N, Kusakabe T, Hiruma H, Takenaka T, Tomita T, Kawakami T: Expression of neurotrophins and their receptors in peripheral lung cells of mice. *Histochem Cell Biol* 2002;118:51-58.
66. Freund V, Pons F, Joly V, Mathieu E, Martinet N, Frossard N: Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 2002;20:458-463.
67. Olgart C, Frossard N: Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J* 2001;18:115-121.
68. Kanda N, Watanabe S: Histamine enhances the production of nerve growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003;121:570-577.
69. Skaper SD, Pollock M, Facci L: Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;97:177-185.
70. Xiang Z, Nilsson G: IgE receptor-mediated release of nerve growth factor by mast cells. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1379-1386.
71. Sawada J, Itakura A, Tanaka A, Furusaka T, Matsuda H: Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways. *Blood* 2000;95:2052-2058.

72. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Seybold J, Kunkel G: The production, storage and release of the neurotrophins nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Clin Exp Allergy* 2003;33:649-654.
73. Schulte-Herbruggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, Braun A: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol* 2005;160:204-209.
74. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R: Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 1999;189:865-870.
75. Lommatzsch M, Schloetcke K, Klotz J, Schuhbaeck K, Zingler D, Zingler C, Schulte-Herbruggen O, Gill H, Schuff-Werner P, Virchow JC: Brain-derived neurotrophic factor in platelets and airflow limitation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:115-120.
76. Aloe L, Tuveri MA, Carcassi U, Levi-Montalcini R: Nerve growth factor in the synovial fluid of patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;35:351-355.
77. Bracci-Laudiero L, Aloe L, Levi-Montalcini R, Galeazzi M, Schilter D, Scully JL, Otten U: Increased levels of NGF in sera of systemic lupus erythematosus patients. *Neuroreport* 1993;4:563-565.
78. Tuveri MA, Passiu G, Mathieu A, Aloe L: Nerve growth factor and mast cell distribution in the skin of patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:319-322.
79. Laudiero LB, Aloe L, Levi-Montalcini R, Buttinelli C, Schilter D, Gillessen S, Otten U: Multiple sclerosis patients express increased levels of beta-nerve growth factor in cerebrospinal fluid. *Neurosci Lett* 1992;147:9-12.
80. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F: Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 2000;20:5283-5291.
81. Aloe L, Moroni R, Mollinari C, Tirassa P: *Schistosoma mansoni* infection enhances the levels of NGF in the liver and hypothalamus of mice. *Neuroreport* 1994;5:1030-1032.
82. Kanaan SA, Saade NE, Karam M, Khansa H, Jabbur SJ, Jurjus AR: Hyperalgesia and upregulation of cytokines and nerve growth factor by cutaneous leishmaniasis in mice. *Pain* 2000;85:477-482.
83. Hu C, Wedde-Beer K, Auais A, Rodriguez MM, Piedimonte G: Nerve growth factor and nerve growth factor receptors in respiratory syncytial virus-infected lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L494-502.
84. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ: A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54:597-606.
85. Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M: Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 2003;54:70-75.



86. Lindefors N, Brodin E, Metsis M: Spatiotemporal selective effects on brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNA in rat hippocampus by electroconvulsive shock. *Neuroscience* 1995;65:661-670.
87. Monteleone P, Fabrazzo M, Martiadis V, Serritella C, Pannuto M, Maj M: Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to co-morbid depression, psychopathology and hormonal variables. *Psychol Med* 2005;35:897-905.
88. Indo Y: Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA(NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Clin Auton Res* 2002;12 Suppl 1:120-32.
89. Ricci A, Greco S, Mariotta S, Felici L, Amenta F, Bronzetti E: Neurotrophin and neurotrophin receptor expression in alveolar macrophages: an immunocytochemical study. *Growth Factors* 2000;18:193-202.
90. Bonini S, Lambiase A, 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.
91. 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.
92. Braun A, Lommatzsch M, Renz H: The role of neurotrophins in allergic bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 2000;30:178-186.
93. Carr MJ, Hunter DD, Udem BJ: Neurotrophins and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:1-7.
94. Sanico AM, Stanisiz AM, Gleeson TD, Bora S, Proud D, Bienenstock J, Koliatsos VE, Togias A: Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1631-1635.
95. Kinkelin I, Motzing S, Koltzenburg M, Brocker EB: Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema. *Cell Tissue Res* 2000;302:31-37.
96. Kassel O, de Blay F, Duvernelle C, Olgart C, Israel-Biet D, Krieger P, Moreau L, Muller C, Pauli G, Frossard N: Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1432-1440.
97. 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.
98. Braun A, Lommatzsch M, Lewin GR, Virchow JC, Renz H: Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118:163-165.
99. Raap U, Goltz C, Deneka N, Bruder M, Renz H, Kapp A, Wedi B: Brain-derived neurotrophic factor is increased in atopic dermatitis and modulates eosinophil functions compared with that seen in nonatopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1268-1275.
100. Noga O, Hanf G, Gorges D, Thai Dinh Q, Groneberg DA, Suttorp N, Kunkel G: Regulation of NGF and BDNF by dexamethasone and theophylline in human peripheral eosinophils in allergics and non-allergics. *Regul Pept* 2005.

101. Nockher WA, Renz H: Neurotrophins in inflammatory lung diseases: modulators of cell differentiation and neuroimmune interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:559-578.
102. Braun A, Nockher WA, Renz H: Control of nerve growth and plasticity. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:229-234.
103. Barnes PJ: Neuroeffector mechanisms: the interface between inflammation and neuronal responses. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:S73-81; discussion S81-73.
104. Forsythe P, McGarvey LP, Heaney LG, MacMahon J, Ennis M: Sensory neuropeptides induce histamine release from bronchoalveolar lavage cells in both nonasthmatic coughers and cough variant asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2000;30:225-232.
105. Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T: Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 2003;139:1479-1488.
106. Amann R, Sirinathsinghji DJ, Donnerer J, Liebmann I, Schuligoi R: Stimulation by nerve growth factor of neuropeptide synthesis in the adult rat in vivo: bilateral response to unilateral intraplantar injections. *Neurosci Lett* 1996;203:171-174.
107. Lewin GR, Mendell LM: Nerve growth factor and nociception. *Trends Neurosci* 1993;16:353-359.
108. 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.
109. Renz H: The role of neurotrophins in bronchial asthma. *Eur J Pharmacol* 2001;429:231-237.
110. Hoyle GW, Graham RM, Finkelstein JB, Nguyen KP, Gozal D, Friedman M: Hyperinnervation of the airways in transgenic mice overexpressing nerve growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:149-157.
111. de Vries A, van Rijnsoever C, Engels F, Henricks PA, Nijkamp FP: The role of sensory nerve endings in nerve growth factor-induced airway hyperresponsiveness to histamine in guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 2001;134:771-776.
112. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsman M, Sinicropi D, Burton LE, Peroutka SJ: The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 1994;36:244-246.
113. Venero JL, Hefti F: TrkA NGF receptor expression by non-cholinergic thalamic neurons. *Neuroreport* 1993;4:959-962.
114. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G: Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* 1982;155:1172-1187.
115. Egner W, McKenzie JL, Smith SM, Beard ME, Hart DN: Identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow. Putative differentiation stage of human blood dendritic cells. *J Immunol* 1993;150:3043-3053.
116. Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN: Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* 1988;46:754-761.
117. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DN: Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1999;93:728-736.
118. Olszewski WL: The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. *Lymphat Res Biol* 2003;1:11-21; discussion 21-14.

119. Riva S, Nolli ML, Lutz MB, Citterio S, Girolomoni G, Winzler C, Ricciardi-Castagnoli P: Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. *J Inflamm* 1996;46:98-105.
120. Termeer CC, Hennies J, Voith U, Ahrens T, Weiss JM, Prehm P, Simon JC: Oligosaccharides of hyaluronan are potent activators of dendritic cells. *J Immunol* 2000;165:1863-1870.
121. Vermaelen K, Pauwels R: Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:530-551.
122. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458-1470.
123. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
124. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT: Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol* 1989;121:421-431.
125. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
126. McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N: Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol* 2005;79:17-27.
127. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
128. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
129. Romagnani S: Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* 1995;15:121-129.
130. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M: Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001;2:585-589.
131. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000;100:575-585.
132. Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS: Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7:549-557.
133. Bendelac A, Medzhitov R: Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J Exp Med* 2002;195:F19-23.
134. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.
135. Ezekowitz RAB, Hoffmann JA: Innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996;8:1-2.

136. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC: The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151-155.
137. Borkowski TA, Van Dyke BJ, Schwarzenberger K, McFarland VW, Farr AG, Udey MC: Expression of E-cadherin by murine dendritic cells: E-cadherin as a dendritic cell differentiation antigen characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol* 1994;24:2767-2774.
138. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-923.
139. Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;2:675-680.
140. Romani N, Schuler G: The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer Semin Immunopathol* 1992;13:265-279.
141. Bartosik J: Cytomembrane-derived Birbeck granules transport horseradish peroxidase to the endosomal compartment in the human Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1992;99:53-58.
142. Burke K, Gigli I: Receptors for complement of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 1980;75:46-51.
143. Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E, Elbe A, Maurer D, Stingl G: Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1996;87:1292-1302.
144. Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC: Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997;27:431-441.
145. Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA, Shevach EM: Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med* 1986;163:436-451.
146. Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, Vincent J, Yoneda K, Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S: The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 1999;29:2695-2704.
147. Vermaelen K, Pauwels R: Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:405-409.
148. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R: Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296:490-494.
149. Lambrecht BN: Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy* 2005;60:271-282.
150. Larche M, Till SJ, Haselden BM, North J, Barkans J, Corrigan CJ, Kay AB, Robinson DS: Costimulation through CD86 is involved in airway antigen-presenting cell and T cell responses to allergen in atopic asthmatics. *J Immunol* 1998;161:6375-6382.
151. Rogers PR, Croft M: Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 1999;163:1205-1213.
152. Mahnke K, Enk AH: Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;293:133-150.
153. Enk AH: Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett* 2005;99:8-11.

154. Caroleo MC, Costa N, Bracci-Laudiero L, Aloe L: Human monocyte/macrophages activate by exposure to LPS overexpress NGF and NGF receptors. *J Neuroimmunol* 2001;113:193-201.
155. la Sala A, Corinti S, Federici M, Saragovi HU, Girolomoni G: Ligand activation of nerve growth factor receptor TrkA protects monocytes from apoptosis. *J Leukoc Biol* 2000;68:104-110.
156. Pezzati P, Stanisiz AM, Marshall JS, Bienenstock J, Stead RH: Expression of nerve growth factor receptor immunoreactivity on follicular dendritic cells from human mucosa associated lymphoid tissues. *Immunology* 1992;76:485-490.
157. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME: Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996;273:959-963.
158. Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA, Greenberg ME: Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 1998;18:1946-1955.
159. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70:401-410.
160. Van Aelst L, D'Souza-Schorey C: Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-2322.
161. Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE: A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* 1998;141:1147-1157.
162. Bar-Sagi D, Hall A: Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 2000;103:227-238.
163. Swetman CA, Leverrier Y, Garg R, Gan CH, Ridley AJ, Katz DR, Chain BM: Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases. *Eur J Immunol* 2002;32:2074-2083.
164. Chomarat P, Banchereau J: An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 1997;8:333-344.
165. Corry DB: IL-13 in allergy: home at last. *Curr Opin Immunol* 1999;11:610-614.
166. Chomarat P, Banchereau J: Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* 1998;17:1-52.
167. Maggi E: The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology* 1998;3:233-244.
168. Romagnani S: Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:395-400.
169. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T: IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003;149:1-38.
170. Wolvekamp MC, Marquet RL: Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 1990;24:1-9.
171. Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S: Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:257-270.
172. Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB: IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol* 2003;170:4457-4464.
173. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A: IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822.
174. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991;174:1209-1220.

175. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S: Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150:353-360.
176. Finbloom DS, Winestock KD: IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995;155:1079-1090.
177. Akdis M, Blaser K, Akdis CA: T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:961-968; quiz 969.
178. Akdis CA, Blaser K: Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression. *Immunology* 2001;103:131-136.
179. Akdis CA, Blaser K: Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. *Microbes Infect* 2001;3:891-898.
180. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, de Boer M, Goldman M: B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol* 1994;152:4368-4374.
181. Mosmann TR, Sad S: The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.
182. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;3:133-146.
183. Bazzoni F, Beutler B: The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334:1717-1725.
184. Wajant H, Henkler F, Scheurich P: The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal* 2001;13:389-400.
185. Coward WR, Okayama Y, Sagara H, Wilson SJ, Holgate ST, Church MK: NF-kappa B and TNF-alpha: a positive autocrine loop in human lung mast cells? *J Immunol* 2002;169:5287-5293.
186. Aggarwal BB: Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3:745-756.
187. Prud'homme GJ, Piccirillo CA: The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2000;14:23-42.
188. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
189. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
190. Taylor SJ, Resnick RJ, Shalloway D: Nonradioactive determination of Ras-GTP levels using activated ras interaction assay. *Methods Enzymol* 2001;333:333-342.
191. Rost B, Hanf G, Ohnemus U, Otto-Knapp R, Groneberg DA, Kunkel G, Noga O: Monocytes of allergics and non-allergics produce, store and release the neurotrophins NGF, BDNF and NT-3. *Regul Pept* 2005;124:19-25.
192. Yang Y, Ochando J, Yopp A, Bromberg JS, Ding Y: IL-6 plays a unique role in initiating c-Maf expression during early stage of CD4 T cell activation. *J Immunol* 2005;174:2720-2729.

193. Kawakami Y, Inagaki N, Salek-Ardakani S, Kitauro J, Tanaka H, Nagao K, Xiao W, Nagai H, Croft M, Kawakami T: Regulation of dendritic cell maturation and function by Bruton's tyrosine kinase via IL-10 and Stat3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005.
194. Path G, Braun A, Meents N, Kerzel S, Quarcoo D, Raap U, Hoyle GW, Nockher WA, Renz H: Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:818-826.
195. Noga O, Englmann C, Hanf G, Grutzkau A, Guhl S, Kunkel G: Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. *Clin Exp Allergy* 2002;32:1348-1354.
196. Benvenuti F, Hugues S, Walmsley M, Ruf S, Fetler L, Popoff M, Tybulewicz VL, Amigorena S: Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 2004;305:1150-1153.
197. Nusser N, Gosmanova E, Zheng Y, Tigyi G: Nerve growth factor signals through TrkA, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac1 to inactivate RhoA during the initiation of neuronal differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem* 2002;277:35840-35846.
198. Yamauchi J, Chan JR, Shooter EM: Neurotrophins regulate Schwann cell migration by activating divergent signaling pathways dependent on Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:8774-8779.
199. Mazzone SB, Canning BJ: Evidence for differential reflex regulation of cholinergic and noncholinergic parasympathetic nerves innervating the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1076-1083.
200. O'Connor BJ, Crowther SD, Costello JF, Morley J: Selective airway responsiveness in asthma. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:9-11.
201. Spina D: Airway sensory nerves: a burning issue in asthma? *Thorax* 1996;51:335-337.
202. 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.
203. Weinstock JV, Blum A, Walder J, Walder R: Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis *mansoni* produce substance P. *J Immunol* 1988;141:961-966.
204. Bost KL, Breeding SA, Pascual DW: Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol* 1992;4:105-112.
205. Joos GF, Germonpre PR, Pauwels RA: Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 2000;55:321-337.
206. Tomaki M, Ichinose M, Miura M, Hirayama Y, Yamauchi H, Nakajima N, Shirato K: Elevated substance P content in induced sputum from patients with asthma and patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:613-617.
207. Bar-Shavit Z, Goldman R, Stabinsky Y, Gottlieb P, Fridkin M, Teichberg VI, Blumberg S: Enhancement of phagocytosis - a newly found activity of substance P residing in its N-terminal tetrapeptide sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:1445-1451.
208. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD: Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159:5654-5660.
209. Vedder H, Affolter HU, Otten U: Nerve growth factor (NGF) regulates tachykinin gene expression and biosynthesis in rat sensory neurons during early postnatal development. *Neuropeptides* 1993;24:351-357.

210. Hunter DD, Myers AC, Udem BJ: Nerve growth factor-induced phenotypic switch in guinea pig airway sensory neurons. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1985-1990.
211. Duhme H, Weiland SK, Rudolph P, Wienke A, Kramer A, Keil U: Asthma and allergies among children in West and East Germany: a comparison between Munster and Greifswald using the ISAAC phase I protocol. *International Study of Asthma and Allergies in Childhood. Eur Respir J* 1998;11:840-847.
212. Kramer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann HE: Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999;353:450-454.
213. Williams H, Robertson C, Stewart A, Ait-Khaled N, Anabwani G, Anderson R, Asher I, Beasley R, Bjorksten B, Burr M, Clayton T, Crane J, Ellwood P, Keil U, Lai C, Mallol J, Martinez F, Mitchell E, Montefort S, Pearce N, Shah J, Sibbald B, Strachan D, von Mutius E, Weiland SK: Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:125-138.
214. Mejias A, Chavez-Bueno S, Ramilo O: Respiratory syncytial virus pneumonia: mechanisms of inflammation and prolonged airway hyperresponsiveness. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:199-204.
215. Aoyagi M, Shimojo N, Sekine K, Nishimuta T, Kohno Y: Respiratory syncytial virus infection suppresses IFN-gamma production of gammadelta T cells. *Clin Exp Immunol* 2003;131:312-317.
216. Tortorolo L, Langer A, Polidori G, Vento G, Stampachiacchere B, Aloe L, Piedimonte G: Neurotrophin overexpression in lower airways of infants with respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:233-237.
217. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, Wright AL, Martinez FD: Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541-545.
218. Leckie MJ, ten Brinke A, Khan J, Diamant Z, O'Connor BJ, Walls CM, Mathur AK, Cowley HC, Chung KF, Djukanovic R, Hansel TT, Holgate ST, Sterk PJ, Barnes PJ: Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2144-2148.
219. Glaab T, Hoymann HG, Hecht M, Korolewicz R, Tschernig T, Hohlfeld JM, Krug N, Braun A: Effect of anti-nerve growth factor on early and late airway responses in allergic rats. *Allergy* 2003;58:900-904.
220. Rumsey WL, Aharony D, Bialecki RA, Abbott BM, Barthlow HG, Caccese R, Ghanekar S, Lengel D, McCarthy M, Wenrich B, Udem B, Ohnmacht C, Shenvi A, Albert JS, Brown F, Bernstein PR, Russell K: Pharmacological characterization of ZD6021: a novel, orally active antagonist of the tachykinin receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298:307-315.



## **6. Anhang**

### **6.1 Danksagung**

Hiermit möchte ich allen ganz herzlich danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Zunächst möchte ich meinem Betreuer Dr. Oliver Noga für die Bereitstellung des Themas, tatkräftige Unterstützung und das offene Ohr für meine Fragen und Probleme sowie seine Geduld mit mir danken. Außerdem danke ich Dr. Matthias Peiser, Dr. Robert Grosse, Dr. Reinhard Wanner, Dr. Ricarda Joachim und Viktoria Höne für die Unterstützung bei einigen der Versuche. Weiterhin danke ich selbstverständlich meinen Eltern für ihre Unterstützung in guten und in schlechten Tagen und für den Einsatz bei der Betreuung meines Sohnes sowie meinen Freunden Nicole Masur und Georg Hilfenhaus für das Lesen des Manuskriptes, Verena Graichen und Anna Langenbach für ihre wertvolle Unterstützung bei diversen Problemen mit Word. Anna Melchers und Friederike Kremer danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung. Meinem Sohn Friedrich danke ich für die Aufrechterhaltung meiner guten Laune sowie meiner Motivation. Dem Team aus der Asthma-Poliklinik danke ich für das eine oder andere nette Gespräch zwischen den Versuchen und das hin und wieder Aufpassen auf meinen Sohn Friedrich. Dem Team aus dem Labor der Infektiologie danke ich für die Bereitstellung der Möglichkeiten für die Entwicklung meiner Western Blots sowie das eine oder andere hilfreiche Gespräch. Letzten Endes möchte ich mich ganz herzlich bei allen freiwilligen Blutspendern bedanken.

## 6.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

### Publikationen:

Noga O, Peiser M, Altenahr M, Knieling H, Wanner R, Hanf G, Grosse R, Suttorp N: *Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor*. Clin Exp Allergy 2007;37:1701-1708.

Noga O, Peiser M, Altenahr M, Schmeck B, Wanner R, Dinh QT, Hanf G, Suttorp N: *Selective induction of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor by LPS and allergen in dendritic cells*. Clin Exp Allergy 2007.

### **6.3 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Martina Altenähr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Die Rolle der Neurotrophine und die Aktivierung Dendritischer Zellen bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 06.08.2008