

5 Diskussion

5.1 Fragestellung, Methodik und Ergebnisse

Es wurde von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bereits auf Protein- und Transkriptionsebene nachgewiesen, daß eosinophile Granulozyten die Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3 produzieren und die für die Neurotrophine spezifischen Rezeptoren Trk A, B und C exprimieren (56, 65).

Da man sowohl im Blut als auch im Lungengewebe von an allergischem Asthma erkrankten Personen erhöhte Eosinophilenzahlen gefunden hat (1), geht man schon seit längerem davon aus, daß die ursprünglich nur mit der Abwehr von parasitären Infektionen in Verbindung gebrachten eosinophilen Granulozyten in der Pathogenese der allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen.

Neuer ist die Erkenntnis, daß Neurotrophine Einfluß haben auf die Pathogenese allergischer Erkrankungen, beispielsweise die Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität, Beteiligung an der sogenannten neurogenen Entzündung, modulierender Einfluß auf viele Komponenten des Immunsystems. Die NGF-Konzentration in Serum und Schleimhäuten bei Atopikern ist erhöht (130).

Ein Ansatz in der Therapie von Erkrankungen des atopischen Formenkreises ist daher die Unterdrückung der Produktion und Freisetzung von NGF.

Bekannt ist bereits, daß durch die Gabe von inhalativen Glukokortikoiden bei Atopikern der Gehalt des im Blut zirkulierenden NGF gesenkt wird (130). Hier stellt sich die Frage, über welche Mechanismen dieser Effekt zustande kommt und welche der als NGF-Quellen bekannten Zellen beeinflusst werden. Für eosinophile Granulozyten haben wir gefunden, daß das Glukokortikoid Dexamethason in therapeutischer Dosierung von 0,1 μM die Produktion und Freisetzung von NGF bei allergischen Personen *in vitro* unterdrückt.

Nachgewiesen wurde der Effekt auf Proteinebene mittels ELISA, ein Verfahren, mit dem der intra- und extrazelluläre Proteingehalt der mit Dexamethason inkubierten und der ohne Stimulans inkubierten Proben photometrisch bestimmt wurde. Sowohl in den Lysaten als auch

in den Überständen der Allergiker war der NGF-Gehalt nach Inkubation mit Dexamethason signifikant erniedrigt.

Es ist zu erwarten, daß bei Atopikern auch andere neurotrophinproduzierende Zellen des Immunsystems in gleicher Richtung beeinflusst werden, was Gegenstand weiterer Untersuchungen bleibt.

Bei den Proben nichtallergischer Personen fand sich dieser Effekt nicht so ausgeprägt, hier war der NGF-Gehalt bei den unstimulierten Proben von vornherein geringer als bei den unstimulierten Proben der Allergiker, was bedeuten kann, daß vor allem bereits aktivierte eosinophile Granulozyten durch das Glukokortikoid beeinflusst werden.

Bestätigt wurden die Ergebnisse durch das Western-Blot-Verfahren, bei dem Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden können. Die vorher über 18 Stunden mit Dexamethason inkubierten Proben zeigen schwächere Banden für NGF als die ohne Stimulans inkubierten Proben, was für einen geringeren NGF-Gehalt der stimulierten Proben spricht.

Auch auf Transkriptionsebene wurde der Effekt mittels PCR nachgewiesen. Die Banden, die amplifizierte mRNA für NGF zeigen, sind bei den mit Dexamethason inkubierten Proben schwächer ausgeprägt als bei den nicht stimulierten Proben. Die Produktion von NGF wird demnach schon auf der Transkriptionsebene durch Dexamethason unterdrückt.

Es ist bekannt, daß Glukokortikoide über intrazelluläre Rezeptoren die Expression von Genen unterdrücken, die für an dem Entzündungsvorgang beteiligte Substanzen kodieren wie Zytokine, Chemokine, Zelloberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Proteinase und andere Enzyme. Wir haben nachgewiesen, daß auch die Produktion von NGF bereits auf Transkriptionsebene durch Dexamethason unterbunden wird.

Die Glukokortikoide binden an den Glukokortikoidrezeptor, der zytoplasmal gebunden an Chaperons vorliegt. Bei Ligandenbindung werden die Chaperons abgestoßen, der Rezeptor bindet sich an spezifische DNA-Sequenzen, die die Transkription entweder aktivieren oder unterdrücken, und dimerisiert. Für die Gene, die für Entzündungsmediatoren kodieren, sind keine suppressiven DNA-Sequenzen mit Glukokortikoidrezeptorbindungsstellen bekannt, man geht davon aus, dass die ligandengebundenen Glukokortikoidrezeptoren mit den aktivierenden Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1 interagieren und deren Funktion behindern.

Besseres Verständnis dieser Grundlagen könnte die gezielte Entwicklung von selektiv wirksamen Glukocortikoiden fördern.

FACS-Analysen bestätigten ebenfalls das Ergebnis. Mittels spezifischer fluoreszierender Antikörper wurde das intrazelluläre NGF markiert, die gemessene Fluoreszenzintensität bei den mit Dexamethason inkubierten Proben war geringer als bei den unstimulierten Proben. Man muß davon ausgehen, daß in vivo die durch Glukokortikoide induzierte Apoptose eine Rolle spielt in der Unterdrückung der Produktion und Freisetzung von NGF. Systemische Gabe von Glukokortikoiden verursacht Eosinopenie (131). Sie modulieren die Überlebenszeit der Eosinophilen in vitro (132). Hagan et al. fanden, dass Dexamethason bei mit IL-5 inkubierten Eosinophilen den Anteil der nach 96 Stunden noch lebenden Eosinophilen von 60% auf 20% senkte. In unserer Arbeitsgruppe betrug die Viabilität der eosinophilen Granulozyten nach 24 Stunden ohne Stimulans und ohne Zugabe von IL-5 noch 40%. Glukokortikoide scheinen die Apoptose direkt auszulösen und indirekt durch Elimination des Überlebensfaktors IL-5 (133).

Glukokortikoide induzieren Apoptose, allerdings in schwächerem Ausmaß, auch bei T-Lymphozyten, die in der Spätphase der allergischen Reaktion ins Gewebe einwandern und mit IL-5 einen wichtigen Chemotaxis- und Überlebensfaktor für Eosinophile ausschütten (134). Da mittels FACS-Analyse der NGF-Gehalt lebender Zellen erniedrigt gemessen wurde, ist davon auszugehen, daß die Unterdrückung der Produktion und Freisetzung von NGF bei Eosinophilen nicht nur durch Apoptoseinduktion, sondern auch über direktes Eingreifen in die zellulären Mechanismen stattfindet.

Die isolierten eosinophilen Granulozyten sprachen nicht in gleichem Maße auf die Stimulationsversuche mit Dexamethason an, bei Allergikern wurde insgesamt die Neurotrophinproduktion und –freisetzung stärker unterdrückt als bei nichtallergischen Personen, allerdings gab es unabhängig davon, ob die Person erkrankt war oder nicht, einzelne Proben, bei denen die Neurotrophinproduktion durch Dexamethason nicht oder kaum beeinflusst wurde. Es scheinen nicht alle eosinophilen Granulozyten in gleichem Maße Glukokortikoid-Rezeptoren zu exprimieren, was zu der Beobachtung von Prin et al. passt, dass die Menschen unterschiedlich auf Kortikoidbehandlung ansprechen (115).

Über den Einfluß von BDNF auf die allergische Reaktion ist weniger bekannt. Noga et al. hatten gefunden, daß der intrazelluläre BDNF-Gehalt bei Eosinophilen und Monozyten bei

Atopikern im Vergleich zu Nicht-Atopikern erniedrigt ist (56). Dieser Effekt war in unseren Versuchen reproduzierbar. Die Produktion und Freisetzung von BDNF wurde bei uns durch Dexamethason und Theophyllin nicht maßgeblich beeinflusst.

5.2 Bedeutung der verringerten NGF-Freisetzung für die bronchiale Hyperreagibilität

Ein Ligand für die M2-Rezeptoren der Nervenfasern ist das MBP aus den Eosinophilen, dessen Ausschüttung durch NGF gefördert wird. Wenn die NGF-Ausschüttung durch Kortikoide unterdrückt wird und über diesen Weg indirekt die MBP-Ausschüttung gedrosselt wird, werden die M2-Rezeptoren nicht beeinflusst, und die Ausbildung einer bronchialen Hyperreagibilität über diesen Mechanismus wird behindert. Eine toxisch-entzündlich induzierte Blasenhyperreflexie bei Mäusen ließ sich durch NGF-Antagonisten positiv beeinflussen (9). Bei Meerschweinchen waren NGF-Antagonisten in der Lage, eine Bronchokonstriktion zu mildern (135). Bei nasaler Applikation von Anti-NGF bei sensibilisierten Mäusen wird die IL-4-Ausschüttung und Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität verhindert (22).

Zusätzlich verhindern niedrige Dosen Dexamethason zwar nicht die Einwanderung und Anreicherung von Eosinophilen im Lungengewebe, aber die Akkumulation um die Nervenendigungen herum. Dies kann daran liegen, dass Dexamethason die Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in parasymphatischen Nerven inhibiert, wie Jacoby et al. herausfanden (25). Durch die Verhinderung der Akkumulation sind die Eosinophilen nicht in der Lage, die M2-Rezeptoren der Nerven zu beeinflussen und die bronchiale Hyperreaktivität zu bewirken.

5.3 Bedeutung für die neurogene Entzündung

Die Ausschüttung der Neurokinine Substanz P und Neurokinin A wird durch NGF angeregt (11). Durch die Unterdrückung der NGF-Produktion und -Freisetzung ins Gewebe wird indirekt die Freisetzung der Tachykinine Substanz P und Neurokinin A unterdrückt und damit die Entstehung der neurogenen Entzündung erschwert.

Ferner ist bekannt, daß Glukokortikoide die Menge an mRNA für die NK1- und NK2-Rezeptoren im Gewebe von an Asthma erkrankten Personen vermindern. (20). Bei Herabregulation der Anzahl der Rezeptoren wird die Wirkungskraft der Tachykinine Substanz P und Neurokinin A vermindert, die Folgen wie die über den NK2-Rezeptor und Substanz P vermittelte Vasodilatation und Mucushypersekretion und die über den NK1-Rezeptor und Neurokinin A vermittelte Kontraktion der glatten Muskelzellen werden verringert.

5.4 Einfluß auf die immunmodulatorische Funktion der Eosinophilen

NGF wirkt auf viele Zellen des Immunsystems protektiv, aktivierend oder chemotaktisch. Durch die Unterdrückung der Produktion und Ausschüttung von NGF mittels Dexamethason wird die Entzündungskaskade an mehreren Stellen unterbrochen. Die immunsuppressive Wirkung und der positive Effekt von Kortikosteroiden bei der Therapie des Asthma bronchiale und vieler Autoimmunerkrankungen ist u.a. auf diese Weise zu erklären. So dient NGF als Wachstumsfaktor für Monozyten-, Makrophagen- und Mastzellkolonien, verhindert die Apoptose bei B-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, fördert die Proliferation von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, wirkt chemotaktisch auf Leukozyten und Mastzellen, vermittelt Mediatorausschüttung von Mastzellen, T-Lymphozyten und eosinophilen und basophilen Granulozyten, fördert die Differenzierung von hämatopoietischen Stammzellen usw (22, 26, 29, 30, 32-35, 38, 56, 65, 165). Viele sich selbst verstärkende Effekte werden unterdrückt, zum Beispiel wird die chemotaktische und aktivierende Wirkung von NGF auf T-Lymphozyten unterbunden, diese schütten daraufhin weniger IL-5 aus, was ein chemotaktisch wirkender und lebensverlängernder Faktor für die NGF-Quelle eosinophiler Granulozyt ist. Die Histaminausschüttung von Mastzellen wird negativ beeinflusst (26). Histamin wirkt chemotaktisch auf andere Zellen des Immunsystems, die wiederum NGF freisetzen und so die Histaminausschüttung der Mastzellen weiter fördern, auch dieser Kreislauf wird bei verringerter Menge an NGF herunterreguliert.

5.5 Immunmodulatorische Wirkung von Theophyllin

Bei den mit Theophyllin inkubierten Zellen stellten wir im Vergleich mit den ohne Stimulans inkubierten Zellen keinen signifikanten Unterschied im Neurotrophingehalt fest, weder bei

Atopikern noch bei Nichtatopikern. Theophyllin wird beim allergischen Asthma bronchiale vornehmlich wegen der bronchodilatatorischen und zentral atemstimulierenden Wirkung eingesetzt, jedoch ist in den letzten Jahren zunehmend über antiinflammatorische Effekte des Theophyllins berichtet worden. Es mildert die Symptome der allergischen Spätreaktion ab (136), unterbindet die Einwanderung von Lymphozyten und Eosinophilen und bewirkt deren Apoptose (131,133) (beeinflusst in therapeutischer Dosierung die unter Zugabe von IL-5 gemessene Viabilität jedoch nicht maßgeblich (137)).

Theophyllin unterdrückt die Produktion chemotaktisch wirksamer Interleukine wie IL4 und IL5, verhindert die Gewebeadhäsion der Granulozyten, bewirkt Mastzellstabilisation und bei Eosinophilen eine Ausschüttung der spezifischen Granula und Superoxidanionen (138-143).

Als Mechanismen werden eine Erhöhung des cAMP über eine Hemmung der Phosphodiesterase und auch eine Wirkung über den Adenosin-3-Rezeptor (144) diskutiert. Theophyllin beeinflusste in unseren Versuchen die Neurotrophinproduktion von Eosinophilen nicht massgeblich, greift also nicht an dieser Stelle in immunmodulatorische Vorgänge ein.

5.6 Zusammenfassung der Diskussion

Es zeigte sich, dass der NGF-Gehalt in den Lysaten und Überständen der mit Dexamethason stimulierten Proben der Allergiker signifikant geringer war als in den unstimulierten Proben. Auch intrazellulär ließ sich der Effekt auf Proteinebene und Transkriptionsebene nachweisen. Bei den Nichtallergikern senkte Dexamethason den NGF-Gehalt herab, jedoch nicht signifikant.

Die Produktion und Freisetzung von BDNF wurde in keiner der beiden Gruppen signifikant beeinflusst. Theophyllin bewirkte keine signifikanten Veränderungen.

NGF ist an verschiedenen mit der allergischen Reaktion zusammenhängenden Mechanismen beteiligt wie der Entstehung der bronchialen Hyperreagibilität, der neurogenen Entzündung und der Inganghaltung der Kaskade der Immunreaktion durch Aktivierung von Entzündungszellen, die ihrerseits wiederum Mediatoren ausschütten.

Es gibt zahlreiche Ansatzpunkte, an denen die antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung der Kortikosteroide ansetzt.

Da das NGF für seine proinflammatorische Wirkung bekannt ist, passt eine Unterdrückung der Produktion und Ausschüttung von NGF durch Dexamethason sehr gut ins Bild.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem NGF-Serumspiegel und emotionalem Stress gefunden (57), an dieser Stelle stellt sich die Frage, ob Menschen, die überdurchschnittlich starkem emotionalen Stress ausgesetzt sind, eher zu mit Neurotrophinen assoziierten Erkrankungen wie dem allergischen Asthma bronchiale neigen.

Inwieweit auch andere Zellen des Immun- und Nervensystems von Dexamethason in ihrer Neurotrophinproduktion beeinflusst werden, bleibt zu eruieren.

Eine gezielte Unterdrückung der Produktion und Ausschüttung von NGF durch Kortikoide ist damit ein Ansatzpunkt in der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten atopischer Erkrankungen.

5.7 Ausblick

Ob die gezielte Unterdrückung der Produktion und Ausschüttung von Neurotrophinen in Zukunft in der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale und anderer mit Neurotrophinen assoziierter Erkrankungen eine Rolle spielen kann, muß durch weiterführende Studien erforscht werden. Die von NGF angeregte sogenannte neurogene Entzündung, bei der proinflammatorische Mediatoren wie Substanz P und Neurokinin A aus sensiblen Nervenfasern ausgeschüttet werden, die Vasodilatation, Schleimsekretion und die Kontraktion glatter Muskelzellen bewirken und durch Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems eine Kettenreaktion in Gang halten, spielt eine Rolle in diesem Zusammenhang, ebenso die Fähigkeit des NGF, Lymphozyten zur IL-5-Ausschüttung anzuregen, einem wichtigen, auch chemotaktisch wirksamen Überlebensfaktor für Eosinophile, wodurch die inflammatorische Reaktion in Gang gehalten wird. NGF scheint auch für andere Zellen des Immunsystems einen Überlebensfaktor darzustellen und chemotaktische und aktivierende Wirkung auszuüben.

Auch an der Entwicklung der bronchialen Hyperreagibilität scheint das NGF beteiligt zu sein, über den Umweg des MPB-Proteins, das von Eosinophilen ausgeschüttet wird und die inhibitorischen Fasern der M2-Rezeptoren blockiert.

Zur Zeit ist man noch dabei, herauszufinden, welche genauen Funktionen die Neurotrophine außerdem im humanen Stoffwechsel ausüben und wie sich ein Eingriff in den Neurotrophin-Haushalt auf das Immunsystem und andere neurotrophinabhängige Systeme wie das Nervensystem auswirken kann. Möglicherweise kann eine gezielte Einflussnahme auf die Neurotrophinproduktion auch bei neuronalen Erkrankungen wie z.B. der Multiplen Sklerose

und Autoimmunerkrankungen in anderen Organsystemen von therapeutischem Nutzen sein. Weiterführende Studien können hier Zusammenhänge aufzeigen.