

**Agonisierung des PAC1-Rezeptors vermittelt
antiinflammatorische Effekte in murinen Modellen für
allergisches Asthma**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Hans-Dieter Lauenstein
geboren am 29.08.1977 in Hamburg

2010

Referent: Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo

Koreferent: PD Dr. Armin Braun

Tag der Promotion: 16.03.2010

Zusammenfassung

Asthma ist eine schwerwiegende Erkrankung der Atemwege, deren Pathogenese sowohl von immunologischen als auch von neuronalen Mechanismen gesteuert wird. Das Immunsystem reagiert dabei auf ein an sich harmloses Antigen, wodurch sich eine allergische Atemwegsentzündung etabliert. Diese ist durch Typ 2 T-Helfer Zellen gesteuert und durch eine ausgeprägte Eosinophilie charakterisiert. Auf neuronaler Ebene sind Neuropeptide im Zusammenhang mit Asthma in den letzten Dekaden in den Fokus der Forschung gerückt. Neuropeptide wie *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) und *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) können unter anderem direkt auf entzündliche Reaktionen in den Atemwegen, Bronchokonstriktion und Mukussekretion Einfluss nehmen.

In diesem Projekt wurde eine Beurteilung der pharmakologischen Relevanz des PACAP-Rezeptor 1 (PAC1), der PACAP und VIP bindet, für die Therapie des allergischen Asthma bronchiale anhand verschiedener muriner Asthmodelle vorgenommen. In den Modellen konnten unter Verwendung des Modellallergens Ovalbumin (OVA) asthmatypische inflammatorische und Atemwegs-konstriktorische Mechanismen dargestellt werden. Dabei wurde der Neuropeptid Rezeptor PAC1 mit dem Peptid Maxadilan agonisiert und mit dem Peptid M65 antagonisiert.

Durch die Agonisierung des PAC1-Rezeptors mit Maxadilan wurde die OVA induzierte Atemwegsentzündung in der akuten Phase der Modelle erfolgreich unterdrückt, während die Antagonisierung mit M65 proinflammatorische Effekte induzierte. Die Atemwegshyperreagibilität wurde nicht beeinflusst. Bei wiederholter Applikation erwiesen sich beide Peptide als immunogen und induzierten eine spezifische Immunantwort.

Die Ergebnisse deuten auf einen starken PAC1 vermittelten antiinflammatorischen Effekt den verwendeten Asthmodellen hin, während die Atemwegshyperreagibilität nicht beeinflusst wird.

Der PAC1 Rezeptor bietet einen effektiven Mechanismus in die allergische Entzündung des allergischen Asthma agonistisch einzugreifen. Allerdings ist das Peptid Maxadilan zum therapeutischen Einsatz aufgrund der immunogenen Eigenschaften ungeeignet.

Abstract

Allergic asthma is a disease of the airways, which is strongly dependent on both, the immune system and the nervous system. Initially the immune system is sensitized to a per se harmless antigen, inducing the development of an inflammation in the airways. This inflammation is type 2 T-helper cells driven and characterized by invading eosinophils into the lung tissue. During the last decades intense research was performed on the role of neuropeptides in asthma. Neuropeptides like vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase polypeptide (PACAP) directly influence inflammation, bronchoconstriction and mucus secretion in the airways.

In this project an assessment of the pharmacological importance of the PACAP receptor 1 (PAC1) in terms of a potential asthma therapy has been performed, using different murine models of asthma. Both VIP and PACAP represent endogenous ligands for PAC1. Asthma related mechanisms like inflammation and airway hyper-responsiveness (AHR) have been induced in mice using Ovalbumin (OVA) as a model allergen. In these models the PAC1 receptor was agonised using the specific PAC1 agonist maxadilan and antagonised by its deleted formulation M65, which represents a specific PAC1 antagonist.

Agonisation of the PAC1 receptor by maxadilan lead to a reduction of the OVA induced airway inflammation, while the antagonisation of PAC1 in contrast lead to proinflammatory effects in the lung. AHR was not affected, neither by maxadilan nor by M65 treatment. Long term administration of either maxadilan or M65 induced specific immune responses.

The results indicate strong antiinflammatory effects by PAC1 agonisation in the used asthma models, while the AHR remained unaffected. Therefore the PAC1 receptor represents a potent target for the treatment of asthma by agonisation in terms of airway inflammation. However, long term administration of the used PAC1 agonist maxadilan is not recommended, because of possible immunogenic effects.

Schlagworte: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1, Allergie,
Neuropeptide

Keywords: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1, Allergy,
Neuropeptides

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
<i>1.1 Asthma bronchiale und seine gesundheitswissenschaftliche Bedeutung</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Pathogenese des Asthma bronchiale</i>	<i>1</i>
1.2.1 Die Frühphasereaktion	2
1.2.2 Die Spätphasereaktion	3
1.2.3 Atemwegshyperreagibilität	4
<i>1.3 Therapie des Asthma bronchiale</i>	<i>6</i>
1.3.1 Kausale Therapie	7
1.3.2 Symptomatische Therapie	7
<i>1.4 Neuropeptide</i>	<i>10</i>
1.4.1 Tachykinine	10
1.4.2 Calcitonin gene related peptide	11
1.4.3 Vasoactive intestinal polypeptide und pituitary adenylate cyclase activating polypeptide	12
1.4.4 Maxadilan und M65	14
1.5 Hypothese	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Herstellerverzeichnis	16
2.2 Chemikalien	18
2.3 Antikörper	19
2.4 Analysesysteme	20
2.5 Geräte	20
2.6 Verbrauchsmaterial	21
2.7 Puffer und Lösungen	22
2.8 Medikamente	24
2.9 Testsubstanzen	24
2.10 Gruppeneinteilung Versuchstiere	24
2.11 Haltung der Versuchstiere	26
2.12 Versuchsprotokolle	26
2.13 Behandlungen	28

2.14 Dosisfindung	29
2.15 Analyse der Atemwegshyperreagibilität	32
2.16 Analyse der neuronalen Hyperreagibilität	34
2.17 Analyse	34
2.18 Isolation pulmonaler DC und Makrophagen	35
2.18.1 Gewebeaufschluss	35
2.18.2 MACS Isolation	36
2.18.3 Fluoreszenzzytometrische Zellsortierung	37
2.19 Isolation naiver T-Zellen	38
2.19.1 Gewebeaufschluss	38
2.19.2 MACS Isolation	39
2.20 Quantitative PCR	39
2.20.1 RNA-Isolation	39
2.20.2 DNA-Verdau	41
2.20.3 Reverse Transkription	41
2.20.4 Real-Time PCR	42
2.20.5 Primersequenzen und Amplifikate	43
2.20.6 Gel-Elektrophorese	45
2.21 ELISA	46
2.22 Azan-Novum-Färbung nach Geidies	48
2.23 Masson-Goldner-Färbung	48
2.24 Fluoreszenzfärbungen	49
2.25 Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheim	49
2.26 Statistik	50
3 Ergebnisse	51
3.1 VIP/PACAP Rezeptor Expression	51
3.2 PAC1 im akuten Modell	53
3.2.1 Entzündung	53
3.2.2 Lungenfunktion	57
3.3 PAC1 im chronischen Modell	58
3.3.1 Akute Phase Entzündung	59
3.3.2 Akute Phase Lungenfunktion	69
3.3.3 Entzündung Verlauf	70
3.3.4 Lungenfunktion Verlauf	83

3.3.5 Immunogenität der Testsubstanzen	83
4 Diskussion.....	86
4.1 Expression von PAC1 in der Lunge.....	86
4.2 Antiinflammatorische Effekte durch PAC1 Agonisierung	86
4.3 Immunogenität der Peptide Maxadilan und M65	91
4.4 PAC1 induzierte Effekte auf die Lungenfunktion	92
4.5 Pharmakologische Bedeutung des PAC1 Rezeptors und Maxadilan	93
5 Anhang.....	95
A1 Literaturverzeichnis	95
A2 Abkürzungsverzeichnis	106
A3 Abbildungsverzeichnis	109
A4 Tabellenverzeichnis	111
A5 Veröffentlichungen	112
A6 Lebenslauf	115
A7 Danksagung	117
A8 Erklärung zur Dissertation	119

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale und seine gesundheitswissenschaftliche Bedeutung

Einer Schätzung der Weltgesundheitsorganisation zur Folge lag die Zahl der an Asthma erkrankten Menschen weltweit für das Jahr 2007 bei ca. 300.000.000 (1). Im Jahr 2005 starben 255.000 Menschen weltweit an den Folgen asthmatischer Erkrankungen. Die Inzidenz des allergischen Asthmas stieg in den letzten Dekaden (2) und bereits jetzt ist Asthma die am weitesten verbreitete chronische Erkrankung bei Kindern (1). Zurzeit ist eine Heilung allergischen Asthmas nicht möglich. Auch die spezifische Immunbehandlung (SIT), die im Falle vieler allergischer Erkrankungen erfolgreich zum Einsatz kommt und die in vielen Fällen eine dauerhafte Unterdrückung Allergie bedingter Symptome leistet, wird in der Asthmatherapie nur als zusätzliche Therapiemöglichkeit zu symptomatischen Standardtherapien angesehen, durch die optimaler Weise eine Reduktion der Symptomatik erzielt wird (3).

1.2 Pathogenese des Asthma bronchiale

Allergisches Asthma ist eine chronisch entzündliche Atemwegserkrankung, die sich infolge einer überschießenden Immunantwort auf an sich ungefährliche Aeroallergene entwickelt. Asthma ist mit einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) auf unspezifische Stimuli, episodischem Auftreten von Atemwegsobstruktion und mit einer Atemwegsentzündung mit ausgeprägter Eosinophilie assoziiert (4). Klinisch ist Asthma durch wiederkehrendes Auftreten von Luftnot, Engegefühl der Brust und Husten charakterisiert (5).

Aus immunologischer Sicht wird allergisches Asthma durch eine Sensibilisierung initiiert (Abb. 1). Dabei treffen allergene Partikel in der Lunge auf dendritische Zellen (DC), die das Allergen aufnehmen und prozessieren. Nach Reifung und Migration zu den lokalen Lymphknoten präsentieren DC an *major histocompatibility complex*- (MHC) Klasse-II-Molekülen gebundene Peptide des Allergens. Der MHC-II Rezeptor mit den gebundenen Allergenfragmenten wird von allergenspezifischen naiven T-Zellen erkannt. Die allergenspezifischen T-Zellen werden zur Expansion und Differenzierung zu Th2-Zellen angeregt, welche die Leitzytokine Th2-gerichteter Immunantworten Interleukin-4 (IL-4), IL-5

und IL-13 sezernieren. Durch Th2-Zellen werden antigenspezifische B-Zellen rekrutiert, die durch die Sekretion von IL-4 und IL-13 zum Isotypwechsel zu Immunglobulin E (IgE) angeregt werden (4, 6). Zusätzlich wird eine klonale Expansion der B-Zellen induziert (7). Es kommt sowohl bei allergenspezifischen B-Zellen, als auch bei allergenspezifischen Th2-Zellen zur Bildung von Gedächtnis-Zellen (7), wodurch bei erneutem Allergenkontakt eine schnelle spezifische Immunantwort ausgelöst werden kann.

Das von B-Zellen freigesetzte allergenspezifische IgE bindet an den hochaffinen Fc ϵ -Rezeptor I auf Mastzellen und basophilen Granulozyten im Lungengewebe, durch die bei erneutem Allergenkontakt die allergische Reaktion initiiert wird. Diese wird in eine Frühphase- und eine Spätphasereaktion unterteilt.

1.2.1 Die Frühphasereaktion

In der Frühphasereaktion werden durch Mastzellen nach Quervernetzung der Fc ϵ -Rezeptoren durch das Binden von Allergenen bei Allergenkontakt innerhalb kürzester Zeit diverse Mediatoren freigesetzt. Dazu gehört Histamin, welches bronchokonstriktorisch und vasodilatatorisch wirkt und somit zur Ödembildung beiträgt. Weiterhin induziert Histamin die Produktion von Mukus (8). Weitere von Mastzellen freigesetzte Mediatoren sind Tumornekrosefaktor (TNF)- α , welches an der Rekrutierung von Lymphozyten beteiligt ist (9), IL-3, IL-5 und GM-CSF, die für die Reifung, Rekrutierung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten verantwortlich sind. *Macrophage inflammatory protein 1- α* (Mip-1 α), welches eine weitere Histaminfreisetzung durch Mastzellen und basophile Granulozyten bewirken kann (10) und auf diverse Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkt, wird ebenfalls ausgeschüttet. Neben den genannten werden noch weitere proinflammatorische Zytokine und Chemokine durch Mastzellen freigesetzt wie Leukotriene und *platelet activating factor* (PAF), die ebenfalls die Mukussekrektion fördern, eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur induzieren und die Invasion proinflammatorischer Zellen fördern (11, 12).

1.2.2 Die Spätphasereaktion

Die Spätphasereaktion beginnt 3-6 Stunden nach Allergenkontakt und kann über einen Zeitraum von mehreren Tagen persistieren. Sie geht mit einer Bronchokonstriktion und AHR einher und kann sich bei fortbestehenden Symptomen zu chronischem Asthma entwickeln.

Die allergische Spätreaktion ist durch eine exzessive Entzündung der Atemwege und Umbauprozesse charakterisiert. Diese werden durch vielfältige Mediatoren proinflammatorischer Zellen und residenter Zellen initiiert (13). Darunter finden sich eosinophile Granulozyten, T-Zellen und dendritische Zellen, sowie Endothelzellen, Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur und bronchiale Epithelzellen.

Eosinophile Granulozyten sind eine Leukozytenpopulation, die im Blut mit einer Häufigkeit von ca. 1-3% aller Leukozyten vertreten ist und außerhalb der Blutbahn im gesunden Menschen nur in der gastrointestinalen Mukosa vorhanden ist (14). Bei nicht allergischen Personen kann einer Eosinophilie eine Infektion durch parasitäre Würmer zu Grunde liegen, die der Körper mit eosinophilen Granulozyten bekämpft. Im Falle allergischen Asthmas finden sich Akkumulationen eosinophiler Granulozyten im respiratorischen Trakt. Sie stellen einen wichtigen zellulären Marker der allergischen Atemwegsentszündung dar.

Die Invasion eosinophiler Granulozyten in das Lungengewebe erfolgt chemotaktisch über die Sekretion von Chemokinen wie Eotaxinen (15). Eotaxine werden von Epithelzellen, Endothelzellen und Zellen der Atemwegsmuskulatur sezerniert (16, 17). Im Lungengewebe werden eosinophile Granulozyten durch Zytokine wie IL-3, IL-5, GM-CSF und PAF aktiviert und setzen Mediatoren aus ihren Granula frei. Zu diesen Mediatoren gehören hoch toxische Mediatoren wie *major basic protein* (MBP), *eosinophilic cationic protein* (ECP), *eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) und *eosinophilic peroxidase* (EP), sowie Leukotriene (18, 19). Die von eosinophilen Granulozyten freigesetzten Mediatoren können die extrazelluläre Matrix und Epithelzellen der Atemwege schädigen (12) und zusätzlich bronchokonstriktorische Effekte induzieren (6).

Die Schädigung des Epithels kann zu einer übermäßigen Reizung sensibler Atemwegsneuronen führen, da die Nervenendigungen in der Atemwegswand ohne die intakte Barriere des Epithels für exogene Reize leichter zugänglich sind (20, 21). Diese Reizung kann durch periphere Axon Reflexe, die die Ausschüttung neurogener Mediatoren wie Tachykinine bewirken, zu einer Verstärkung proinflammatorischer und bronchokonstriktorischer Effekte und zur verstärkten Mukussekretion beitragen (22, 23). Die Aktivierung eosinophiler Granulozyten führt weiterhin zur Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen, wie IL-3, IL-4,

IL-5, GM-CSF und TNF- α . Sie sind damit in der Lage durch autokrine Mechanismen weitere eosinophile Granulozyten zu rekrutieren und zu aktivieren (24).

Die durch Th2-Zellen und eosinophile Granulozyten charakterisierte Entzündungsreaktion in der Lunge kann durch die Stimulation von Th2-Zellen durch DC dauerhaft aufrecht erhalten werden und zur Exazerbation des allergischen Asthmas und einer Chronifizierung der Entzündungsreaktion führen (25).

1.2.3 Atemwegshyperreagibilität

Ein charakteristisches symptomatisches Merkmal beim allergischen Asthma ist die Ausbildung einer AHR auf unspezifische Reize. Durch beispielsweise kalte Luft oder Zigarettenrauch wird eine Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur induziert, die allergenunabhängig auftritt. Diese führt im Patienten zu einer erschwerten Atmung.

An der Ausbildung einer AHR sind im allergischen Asthma verschiedene Mediatoren beteiligt, die von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten freigesetzt werden (26, 27), wobei die genauen Mechanismen noch nicht umfassend aufgeklärt wurden (28, 29).

Beispielsweise kann MBP, das von eosinophilen Granulozyten sezerniert wird, nachweislich eine AHR induzieren (11). Es bindet an den inhibitorischen M2-Autorezeptor der parasympathischen Nervenendigung und induziert eine verstärkte Acetylcholinfreisetzung. Die Steigerung der Acetylcholinausschüttung führt zu einer verstärkten Kontraktion der Atemwegsmuskulatur und somit zu einer Verengung der Atemwege (28).

Hinzu kommt die unphysiologische Reizbarkeit des sensiblen Nervensystems durch exogene Reize. In der asthmatischen Lunge wird die Barrierefunktion des Epithels durch Umbauprozesse eingeschränkt. Es kommt zu einer Abschilferung von Epithelzellen und die darunter liegenden Nervenendigungen können ohne das intakte Epithel leichter gereizt werden, was zu einer wie zuvor beschriebenen unphysiologischen Sekretion von Neuropeptiden wie Tachykininen führen kann (21). Als Beispiele hierfür gelten Neurokinine und Substanz P. Diese steigern die reflektorische Konstriktion der glatten Atemwegsmuskulatur und können so an der Ausbildung einer AHR beteiligt sein (29). Durch Modifikationen des Nervensystems wird also direkt der Atemwegsmuskulaturtonus in der asthmatischen Lunge beeinflusst.

Die allergische Reaktion

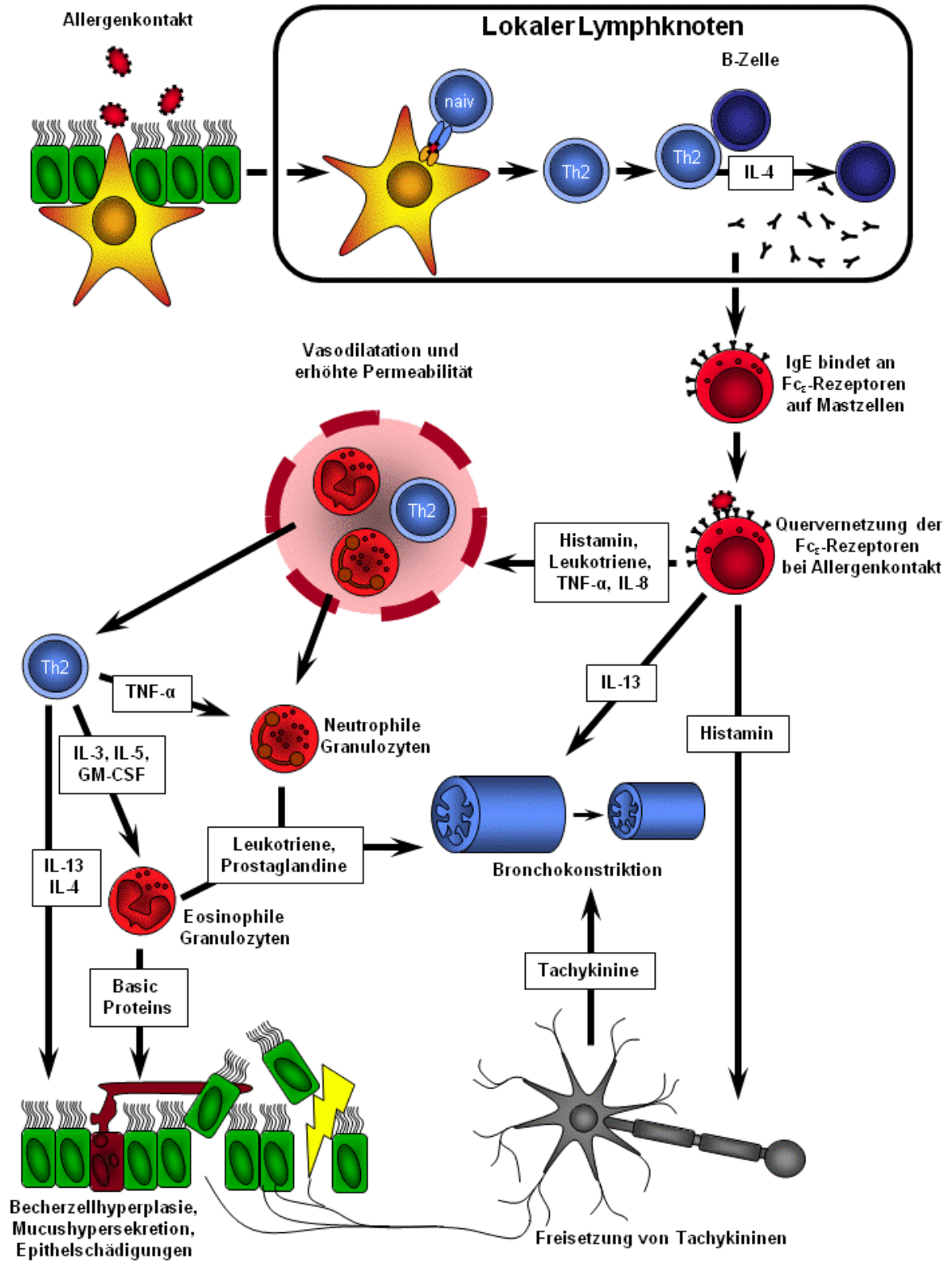


Abb.1: Schematische Übersicht über immunologische und neurologische Vorgänge in der asthmatischen Lunge: Nach dem initialen Allergenkontakt werden Allergenpartikel von DC aufgenommen und im lokalen Lymphknoten prozessiert. Dort werden allergenspezifische naive T-Zellen aktiviert, proliferieren und reifen zu Th2-Zellen aus. Diese aktivieren allergenspezifische B-Zellen, welche ebenfalls proliferieren und nach einem IL-4 abhängigen Isotypwechsel allergenspezifisches IgE produzieren. Dieses bindet an die hochaffinen Fc_ϵ -Rezeptoren auf der Oberfläche von Mastzellen im Lungengewebe. Eine Quervernetzung der Fc_ϵ -Rezeptoren nach erneutem Allergenkontakt führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, die an verschiedenen Reaktionen beteiligt sind. Diese führen unter anderem direkt zur Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, aktivieren Nerven, welche Neuropeptide ausschütten, die ebenfalls an der Bronchokonstriktion beteiligt sind und sie vermitteln gefäßerweiternde Effekte, die eine Freisetzung proinflammatorischer Zellen aus dem Blut erleichtern. Dadurch gelangen Th2-Zellen, eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten in das Gewebe, die ihrerseits direkt an der Bronchokonstriktion beteiligt sind. Des Weiteren wird durch Mediatoren dieser Zellen die Mukusproduktion verstärkt und das Epithel geschädigt. Ohne die intakte Barriere des Epithels sind freiliegende Nervenendigungen durch exogene Reize leichter erregbar, was die neurogenen Komponenten der Bronchokonstriktion verstärkt.

1.3 Therapie des Asthma bronchiale

Die Entstehung allergischen Asthmas ist durch eine allergische Reaktion des Immunsystems bedingt. Die daraus resultierende Atemwegsentzündung wird als eines der Hauptmerkmale des allergischen Asthmas angesehen. Daher wird Asthma oft als immunologische Erkrankung verstanden. Doch obwohl die immunologische Komponente eines der Hauptmerkmale der Erkrankung darstellt, haben sich viele Substanzen, die auf immunrelevanten Komponenten wie IL-4, IL-5 oder IgE basieren, als therapeutisch ineffizient erwiesen (30). Im Gegensatz dazu haben sich Therapeutika wie β_2 -Mimetika und Anticholinergika, die auf Mechanismen des Nervensystems basieren, als effiziente Medikamente in der symptomatischen Asthmatherapie etabliert. Weiterhin ist bekannt, dass psychologische Belastungen, wie Stress, eine Verschlechterung der Asthmasymptome hervorrufen können (31, 32). Der Zustand von Asthmatikern wird stark vom Nervensystem beeinflusst. Daher wurden viele Mediatoren des

Nervensystems auf ihre Relevanz in der Pathogenese des allergischen Asthmas untersucht. Der Gruppe der Neuropeptide kommt dabei eine große Bedeutung zu (33, 34).

1.3.1 Kausale Therapie

Als einzige kausale Therapie zur Behandlung allergischer Erkrankungen wird derzeit die spezifische Immuntherapie (SIT) angewendet. Dabei werden Allergikern hohe Dosen eines Allergenextrakts appliziert, die zu keiner klinischen Symptomatik führen. Die Applikation erfolgt subkutan, oder in neuen Therapieansätzen sublingual. SIT sieht eine Behandlung über einen Zeitraum von drei bis fünf Jahren vor (35, 36). Die Dosis des Allergenextrakts sollte im Verlauf der SIT je nach Verträglichkeit gesteigert werden. Die dauerhafte kontrollierte Allergenexposition führt optimaler Weise zu einer Toleranzinduktion, wodurch bei erneuter Allergenexposition keine klinischen Symptome hervorgerufen werden.

Die SIT ist allerdings nicht bei allen Allergikern indiziert und der Einsatz bei Asthmatikern wird kontrovers diskutiert (37). Laut der aktuellen „Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma“ wird eine SIT nur bei intermittierendem oder leichtgradigem persistierendem Asthma nach Ausschöpfen aller Möglichkeiten der Allergenkenz und medikamentöser Behandlung empfohlen (38). SIT kann also keinesfalls als Alternative zu einer symptomatischen Therapie verstanden werden, sondern als Ergänzung im Asthmanagement. Durch SIT können die Ausmaße der Symptome, die Verwendung symptomatischer Therapeutika und die AHR reduziert werden, während die Lungenfunktion durch SIT kaum beeinflusst wird (39). Es kann daher bei dieser Behandlungsmethode von keiner Heilung gesprochen werden, da sich nur Effekte, die direkt mit der allergischen Reaktion zu tun haben, beeinflussen lassen. Eine weiterführende symptomatische Behandlung ist unerlässlich.

1.3.2 Symptomatische Therapie

Das Ziel der symptomatischen Asthmatherapie ist die Suppression der Atemwegsentszündung, der AHR, der Atemwegsobstruktion und der daraus resultierenden klinischen Symptome. Dazu kommen β_2 -Sympathomimetika, Anticholinergika, Glucocorticoide, Cromone, Theophyllin und Leukotrien-Rezeptorantagonisten zum Einsatz (3). Einige dieser

Therapieansätze basieren auf den grundlegenden Wirkweisen des Sympathikus und des Parasympathikus. Sympathische Nervenreize führen im Respirationstrakt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Atemwege, zu einer Reduktion der Mukussekretion und zu einer Erhöhung des Gefäßwiderstands. Parasympathische Reize führen im Gegensatz dazu zu einer Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur, zur Induktion der Mukussekretion und zu einer Verringerung des Gefäßwiderstands.

β_2 -Sympathomimetika aktivieren Adrenorezeptoren des Sympathikus und induzieren die für den Sympathikus beschriebenen Effekte. Diese können über einen Zeitraum von über 12 Stunden persistieren.

Anticholinergika hingegen hemmen die durch Acetylcholin induzierte Bronchokonstriktion des Parasympathikus, indem die Muscarin Rezeptoren kompetitiv blockiert werden.

Theophyllin ist ein Hemmstoff für Phosphodiesterasen und erhöht so die intrazelluläre Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), was in der glatten Atemwegsmuskulatur zu einer Relaxation führt. Zusätzlich wirkt Theophyllin antagonistisch auf Adenosinrezeptoren. Dabei sind insbesondere die A_1 und A_{2A} -Adenosinrezeptoren an proinflammatorischen Effekten im allergischen Asthma beteiligt. Durch die Antagonisierung wird die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie Leukotriene und Histamin gehemmt.

Leukotrien-Rezeptorantagonisten binden kompetitiv an die CYS-LT1-Rezeptoren, deren Aktivierung eine Verstärkung vorhandener Entzündungsprozesse, sowie eine verstärkte Mukussekretion induziert. Die Blockade durch Leukotrien-Rezeptorantagonisten hemmt diese Effekte.

Weiterhin werden in der Asthma Therapie Cromone verwendet. Cromone werden auch als Mastzellstabilisatoren bezeichnet und interagieren mit Zellwandbestandteilen und/oder intrazellulären Prozessen nach der Fc_ϵ -Quervernetzung bei Allergenkontakt. Die genauen Wirkmechanismen sind bislang nicht hinreichend bekannt.

Die wichtigste Gruppe von Präparaten in der Standardtherapie des allergischen Asthmas sind die Glucocorticoide. Glucocorticoide wie z.B. Dexamethason gehören zur Stoffklasse der Steroide. Glucocorticoide inhibieren nachweislich die Transkription vieler Zytokine der Th2-Antwort (40) und können Zytokine in ihrer Wirkung auch direkt hemmen (41).

Als Cholesterolderivat ist Dexamethason fettlöslich und kann dadurch die Zellmembran durchdringen. Im Zytoplasma trifft es auf den Glucocorticoid-Rezeptor- α (42). Durch die Bindung eines Glucocorticoids wird der Rezeptor aktiviert und in den Zellkern transportiert (43, 44).

Der Komplex aus Rezeptor und Glucocorticoid bindet dort an die Promoterregion bestimmter Gene, deren Expression durch Glucocorticoide induziert wird (45, 46). Durch Glucocorticoide werden die antiinflammatorischen Proteine *secretory leucoprotease inhibitor* und *mitogen activated protein kinase phosphatase 1* (MKP1) aktiviert, die die p38 *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase inhibieren. Durch die p38-MAP-Kinase werden diverse proinflammatorische Gene wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF und IL-8 aktiviert. Weiterhin wird durch p38 der *inhibitor of nuclear factor kappa B* (I κ B- α) aktiviert, der den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) inhibiert (47).

Neben der Aktivierung antiinflammatorischer Gene werden also auch proinflammatorische Gene durch den Rezeptor-Glucocorticoid Komplex im Zellkern inhibiert. Glucocorticoide hemmen neben NF- κ B die Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren *activated protein 1* (AP-1), *signal transducers and activators of transcription* (STAT) und *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (48). Dadurch wird die Transkription diverser proinflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel die Interleukine 1-6, IL-13, TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α , Eotaxin, IL-8, und *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) sowie der Adhäsionsmoleküle *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM1), *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) und E-Selektin inhibiert. Weiterhin wird durch Glucocorticoide die Expression der Tachykininrezeptoren Neurokininrezeptor 1 (NK₁) und NK₂ und des Bradykininrezeptors 2 (B₂) reduziert (41).

Glucocorticoide wirken neben den beschriebenen Mechanismen auch durch posttranskriptionelle Effekte antiinflammatorisch. Nach Aktivierung kann der Glucocorticoid-Rezeptor Komplex die Translationsrate sowie die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) Stabilität beeinflussen und so die Synthese proinflammatorischer Moleküle reduzieren (49).

Bei einer Subpopulation von Patienten sind Glucocorticoide, die als Standardtherapeutikum insbesondere zur Hemmung der allergischen Entzündung eingesetzt werden, kontraindiziert oder weitgehend wirkungslos (50). Dabei sprechen Patienten mit schwerem Asthma schlechter auf eine Therapie mit Glucocorticoiden an, als Patienten mit mildem Asthma (51). Bei hochdosierter systemischer Glucocorticoid Applikation besteht außerdem eine hohe Gefahr der Ausbildung von Nebenwirkungen. Bei Glucocorticoiden stehen hier laut „Patienten Leitlinie zur Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma“ vor allem Gewichtszunahme und Anstieg des Blutzuckers, Knochenentkalkung, sowie eine Verdünnung der Haut im Vordergrund (52). Für die Therapie von allergischem Asthma besteht also ein

großes Interesse an neuen Therapieansätzen. Mögliche Mechanismen in die Pathogenese des allergischen Asthmas einzugreifen bieten die Wirkmechanismen von Neuropeptiden.

1.4 Neuropeptide

Neuropeptide sind kurze Peptide, die primär von sensiblen Nervenfasern exprimiert und sezerniert werden und als neuronale Signalmoleküle dienen. Sie werden insbesondere als Reaktion auf exogene Noxen und proinflammatorische Mediatoren sezerniert. Aber auch nicht neurale Zellen, wie Epithelzellen und Zellen des Immunsystems, sind insbesondere unter entzündlichen Bedingungen zur Expression und Freisetzung von Neuropeptiden in der Lage (53-55). Neuropeptide können direkt regulatorisch auf Zielzellen wirken oder indirekt die Expression von Neuropeptidrezeptoren auf Neuronen, Immunzellen und residenten Zellen der Atemwege modifizieren. Für die Entwicklung potentieller Neuropeptid-basierter Asthmatherapien werden derzeit Tachykinine, *calcitonin gene related peptide* (CGRP), *vasoaktive intestinal polypeptide* (VIP) und *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) als vielversprechende Vertreter dieser Gruppe angesehen.

1.4.1 Tachykinine

Die Vertreter der Tachykinine sind Substanz P (SP), Neurokinin A (NKA) und Neurokinin B (NKB). Tachykinine werden in der Regel nach noxischer Stimulation in Folge eines Axonreflexes sezerniert. In Tiermodellen für allergische Entzündungsreaktionen wurde die neuronale Induktion der Tachykinin-Freisetzung nachgewiesen. Tachykinine beeinflussen aufgrund ihrer proinflammatorischen Effekte auf viele Immunzellen und sind auf diese Weise an der Ausbildung neurogener Entzündungen beteiligt (56).

In den oberen Atemwegen sind Tachykinin-positive Nervenfasern um submukosale Drüsen und in der glatten Muskulatur der Atemwege und Blutgefäße lokalisiert (57, 58). Die Sekretion von Tachykininen konnte aber auch in Zellen des Immunsystems nachgewiesen werden (54, 55). Tachykinine haben unter physiologischen und pathologischen Zuständen regulatorische Funktionen, die den Tonus der glatten Muskulatur der Atemwege und Blutgefäße, die Mukussekretion und die Immunreaktionen betreffen (59-61).

Tachykinine binden an drei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren: NK1, NK2 und NK3, die aufgrund molekularer und pharmakologischer Eigenschaften differenziert werden können (62). SP bindet hauptsächlich an NK1, NKA an NK2 und NKB an NK3 (63-65). Es ist bekannt, dass sich die Expression der Rezeptoren NK1 und NK2 in verschiedenen Geweben unterscheidet: Der NK1 Rezeptor wird vornehmlich im Epithel und um submukosale Drüsen exprimiert, während der NK2 Rezeptor hauptsächlich in der glatten Atemwegsmuskulatur exprimiert wird (66-68).

In Asthmatikern führt sowohl die inhalative, als auch die intravenöse Applikation von NKA zu einer Bronchokonstriktion (22). Durch die Entfernung des Epithels in *ex vivo* Studien im Meerschweinchen wurde nach NKA-Stimulation eine verstärkte Bronchokonstriktion festgestellt (69). Dies kann zum einen durch die fehlende Barrierefunktion des Epithels erklärt werden. Zum anderen entfällt der enzymatische Abbau der Peptide durch Peptidasen wie der neutrophilen Endopeptidase (NEP) beim Passieren des Epithels. Diese Beobachtungen legen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Tachykininen in der Lunge unter pathologischen Bedingungen nahe, in denen das Epithel geschädigt ist, wie beim Asthma bronchiale.

Tachykinine fördern außerdem die Mukussekretion aus submukosalen Drüsen vornehmlich über eine Stimulation des NK1 Rezeptors (23). Des Weiteren kann über den NK1 Rezeptor eine erhöhte Acetylcholin Sezernierung an cholinergen Nervenendigungen und Vasodilatation mit daraus resultierendem Plasma *Leakage* induziert werden (70).

Das Antagonisieren eines der drei Tachykinin Rezeptoren erwies sich sowohl im Tiermodell, als auch in klinischen Studien als vergleichsweise ineffektiv für die Therapie des allergischen Asthmas. Während sich durch die Blockade dualer Tachykininrezeptoren ebenfalls keine Ergebnisse erzielen ließen, die einen breiten Einsatz der Prüfsubstanzen als Therapeutikum rechtfertigt, konnten bei dem Einsatz von Tripple-Tachykinin-Rezeptorantagonisten Symptome des allergischen Asthmas gelindert werden (71, 72).

1.4.2 Calcitonin gene related peptide

CGRP ist ein Neuropeptid, dass ebenfalls immunmodulatorische Effekte hervorrufen kann (73) und es ist zusammen mit Tachykininen in C-Fasern coexprimiert (74, 75). CGRP-Rezeptoren gehören wie die Neurokininrezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembran Domänen (76, 77). Die Aktivität von CGRP wird im Gegensatz zu anderen Neuropeptiden durch *receptor activity modifying proteins* (RAMP) reguliert (78).

In verschiedenen Studien wurden diverse CGRP-induzierte Effekte nachgewiesen. Unter anderem wurden immunmodulatorische Effekte (79, 80), sowie Effekte auf den Tonus der glatten Muskulatur der Atemwege und Blutgefäße (73) nachgewiesen.

Für humane Bronchien konnten nach Entfernung des Epithels bronchokonstriktorische Effekte *in vitro* nachgewiesen werden, während bei Präparationen mit intaktem Epithel keine signifikanten Effekte beobachtet wurden (81).

In humanen Arterien bewirkt CGRP eine Relaxation der glatten Muskulatur (81). CGRP induzierte Effekte auf Bronchien und Blutgefäße konnten durch den CGRP Antagonisten CGRP(8-37) inhibiert werden (81). CGRP induziert die Migration eosinophiler Granulozyten und stimuliert die β -Integrin abhängige T-Zelladhäsion. CGRP induziert allerdings auch antiinflammatorische Effekte. Zum Beispiel inhibiert es die Sekretion von Mediatoren aus Makrophagen und hemmt die Fähigkeit von Makrophagen, T-Zellen zu aktivieren (73). Aufgrund der nur schwer einzuschätzenden Bedeutung von CGRP im allergischen Asthma wurde bisher von der Testung CGRP-basierter Therapeutika im Menschen abgesehen.

Im Hinblick auf die Entwicklung neuropeptidbasierter Therapien des allergischen Asthmas stellen die Wirkungen des VIP/PACAP System die vielversprechendsten Ansatzpunkte dar.

1.4.3 Vasoactive intestinal polypeptide und pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

VIP und PACAP sind Neuropeptide, die im respiratorischen Trakt weit verbreitet sind (82-84). VIP und PACAP binden an drei verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit jeweils 7 Transmembrandomänen: Die VIP und PACAP Rezeptoren *Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1* (VPAC1) und VPAC2 und *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1* (PAC1) (85). Dabei binden VPAC1 und VPAC2 die beiden Neuropeptide VIP und PACAP mit ähnlicher Affinität, während PAC1 PACAP mit einer etwa 1000 fach stärkeren Affinität bindet als VIP (84).

Obwohl viele pulmonale Effekte, die über VIP und PACAP vermittelt werden, bekannt sind, ist eine Zuordnung der beobachteten Effekte zu den einzelnen Rezeptoren schwierig, da VIP und PACAP an die gleichen Rezeptoren binden.

Durch den Einsatz spezifischer Rezeptor Agonisten und Antagonisten konnten jedoch mechanistische Einblicke in manche Effekte gewonnen werden. Bekannte pulmonale Effekte,

die über die drei VIP und PACAP Rezeptoren induziert werden, sind in erster Linie bronchodilatatorischer, vasodilatatorischer und antiinflammatorischer Natur (85-87).

Der Umstand, dass VIP direkt Effekte induziert, die die Situation von Asthmatikern verbessern könnten, birgt einen großen Vorteil gegenüber möglichen Therapien, die auf dem Antagonisieren negativer Einflüsse basieren. Wie sich beispielsweise bei Versuchen der Antagonisierung von Tachykininen herausstellte, können Therapieansätze, die auf der Blockade eines Rezeptors basieren, durch andere Mechanismen kompensiert werden. Im Falle der Tachykinine zeigte erst die Antagonisierung von zwei oder drei der Tachykininrezeptoren ein therapeutischer Erfolg. Durch die Formulierung eines VIP-basierten Therapeutikums könnten direkt bronchodilatatorische und antiinflammatorische Effekte durch das Agonisieren einzelner Rezeptoren erzielt werden. Agonisieren des VIP/PACAP Systems stellt daher eine viel versprechende Möglichkeit der Neuropeptid-basierten Asthmatherapie dar (85).

Natives VIP selbst konnte nach systemischer Applikation in den bisher getesteten Dosen nicht erfolgreich in klinischen Studien als Therapeutikum eingesetzt werden (88, 89). Bei höheren Dosen wurden Nebeneffekte wie Blutdruckabfall und Tachykardie beobachtet. Die Ineffizienz des verabreichten VIP könnte in dem schnellen Abbau des Peptids im Gewebe, vor allem durch die NEP begründet sein (90). Der rasche Abbau durch NEP und andere Peptidasen (91) führt zu einer Spaltung von VIP in physiologisch unwirksame Produkte innerhalb von Sekunden (90). Daher wurde in den letzten Jahren an Modifikationen des Peptids gearbeitet, die es für Peptidasen unzugänglicher machen soll. So wurden kürzlich acetylierte und Polyethylen-Glykol assoziierte VIP Abkömmlinge auf Ihre Verträglichkeit im Menschen getestet (92).

Für die Etablierung einer dauerhaften Therapie sind diese modifizierten Peptide jedoch eher ungeeignet, was insbesondere in den hohen Produktionskosten begründet ist. Die Formulierung synthetischer Rezeptoragonisten gegen alle drei VIP/PACAP Rezeptoren ist ebenfalls unwahrscheinlich, da eine spezifische Wirkung auf drei unterschiedliche Rezeptoren durch ein einziges Pharmakon nur schwer umzusetzen sein wird. Einen einfacheren Ansatz würde die Möglichkeit bieten, mit synthetischen Agonisten gezielt einzelne Rezeptoren dieses Systems anzusprechen. Dazu sind allerdings die genauen Kenntnisse der Funktionen der einzelnen Rezeptoren unumgänglich.

Daher wurden in den letzten Jahren in Hinblick auf die Aufklärung der Funktion der einzelnen Rezeptoren Studien unter Verwendung spezifischer VIP/PACAP Rezeptor Agonisten durchgeführt.

Die Inhalation des spezifischen VPAC2 Liganden Ro25-1553 führte bei Testpersonen mit mittelgradigem Asthma zu einer schnellen Bronchodilatation, deren Qualität mit der des als Kontrolle verabreichten, als Asthmatherapeutikum etablierten β_2 -Sympathomimetikums Formoterol vergleichbar war (93). Eine Schwäche des getesteten Ro25-1553 war die im Vergleich zu Formoterol geringe Wirkdauer von nur 5 Stunden.

Auch immunmodulatorisch konnten für einzelne VIP-Rezeptoren bereits spezifische Funktionen zugeordnet werden. In einem murinen Model für septischen Schock wurden VIP, der VPAC1 Agonist [K15, R16, L27] VIP [1–7]-GRF [8–27] und der VPAC2 Agonist Ro25-1553 getestet. Beide Agonisten und das Peptid VIP erhöhten die Zahl der überlebenden Versuchstiere (94).

Während die VIP/PACAP induzierten bronchodilatatorische Effekte an den VPAC2 Rezeptor adressiert werden konnten, und immunmodulatorische Effekte an den VPAC1 und den VPAC2 Rezeptor ist die Bedeutung des PAC1 Rezeptors im allergischen Asthma noch weitgehend ungeklärt. Maxadilan und M65 stellen als PAC1 spezifischer Agonist und Antagonist effektive Werkzeuge zur Untersuchung der Funktion des PAC1 Rezeptors dar.

1.4.4 Maxadilan und M65

Maxadilan ist ein 63 Aminosäure (AS) langes Peptid, das 1991 aus dem Speichel der Sandfliege *Lutzomyia longipalpis* isoliert wurde. *Lutzomyia longipalpis* ist aufgrund ihrer Funktion als Vektor der Leishmaniose gut charakterisiert. Maxadilan hat seinen Namen aufgrund seiner starken und lang andauernden vasodilatatorischen Eigenschaften (95). Obwohl es keine Homologien zu PACAP oder VIP aufweist bindet es spezifisch an den humanen PAC1-Rezeptor (96). Eine deletierte Form von Maxadilan, die als M65 bezeichnet wird, wurde als spezifischer PAC1 Antagonist charakterisiert (96). Bei M65 wurden die AS 25-41 aus Maxadilan deletiert. Damit bindet M65 den PAC1 Rezeptor, kann ihn aber nicht aktivieren. Das Binden an den Rezeptor macht diesen unzugänglich für endogene Liganden.

1.5 Hypothese

In der vorgelegten Arbeit soll die folgende Hypothese anhand muriner Asthmodelle geprüft werden.

Durch die Agonisierung des PAC1-Rezeptors lassen sich die Symptome allergischen Asthmas reduzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellerverzeichnis

Hersteller	Standort
Abbottec	San Diego, USA
Abbott	Wiesbaden, D
B. Braun	Melsungen, D
BD Pharmingen	Erembodegem, BE
Beckmann Coulter	Krefeld, D
Bestglove	Menlo, USA
Biotrend	Köln, D
Cambrex	Verviers, BE
Charles River	Sulzfeld, D
Chroma	Münster, D
Dianova	Hamburg, D
Dynatech	Deisendorf, D
eBioscience	Hatfield, GB
Eppendorf	Hamburg, D
Faster Better Media LLC	Baltimore, USA
Fluka	Buchs, CH
GATC Biotech	Koblenz, D
Greiner	Nürtlingen, D
Hugo Sachs Electronics	March, D
Invitrogen	Krlsruhe, D
Kem-En-Tec Diagnostics	Kopenhagen, DK
Kindler	Freiburg, D
Kodak	Rochester, USA
Lonza	Basel, CH
Leica	Solms, D
Menzel-Glaser	Braunschweig, D
Merck	Darmstadt, D
Merckle	Blaubeuren, D

Hersteller

Medicago
 Merial
 Miltenyi
 Molecular Probes
 MWG Biotech
 NatuTech
 Neo Lab
 Niepötter
 Notocord
 NUNC
 Pari
 Perbio Science
 Pierce Endogen
 Promega
 Qiagen
 R&D Systems
 Ratiopharm
 Roche Applied Science
 Roth
 Sakura
 Sartorius
 Scanbur
 Serva
 Sharp
 Shandon
 Sarstedt
 Sigma-Aldrich
 Thermo Electron
 UNO Plast
 Validyne Engineering
 Vector Laboratories
 Zeiss

Standort

Uppsala, S
 Halbergmoos, D
 Bergisch Gladbach, D
 Eugene, USA
 Ebersberg, D
 Frankfurt a. M., D
 Heidelberg, D
 Bürstadt, D
 Croissy sur Seine, F
 Wiesbaden, D.
 über Dr. Beckmann
 Bonn, D
 über Perbio Science
 Madison, USA
 Hilden, D
 Minneapolis, USA
 über Merckle
 Mannheim, D
 Karlsruhe, D
 Augsburg, D
 München, D
 Karlslunde, DK
 Heidelberg, D
 München, D
 Frankfurt / M, D
 Nümbrecht, D
 München, D
 Dreieich, D
 Kongens Lyngby, DK
 Northridge, USA
 Burlingham, USA
 Jena, D

2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acetyl- β -methylcholinchlorid	Sigma-Aldrich
Agarose	Promega
Alum Imjekt: Aluminiumhydroxid	Pierce Endogen
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Anilinblau	Merck
BSA	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Capsaicin	Sigma-Aldrich
Collagenase	Roche Diagnostics
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dinatrium-EDTA	Sigma-Aldrich
DNA-Ladder	Promega
DNase	Roche Diagnostics
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Promega
Eukitt	Kindler
FCS	Sigma-Aldrich
Ziegenserum	BD Pharmingen
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kernechtrot	Merck
Lichtgrünlösung	Chroma
Magnesiumhydroxid	Merck
β -Mercaptoethanol	Gibco
Methanol	Sigma-Aldrich
Molybdätosphosphorsäure-Orange-G	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich
OCT	Sakura

Bezeichnung	Hersteller
Orange-G	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich
Ponceau Säurefuchsin	Serva
Primer	MWG-Biotech
Random Primer	Roche Diagnostics
RNase freies Wasser	Qiagen
Schwefelsäure	Roth
Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase	R&D
Sucrose	Biorad
TMB	Kem-En-TEC Diagnostics
Tris	Roth
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vectashield	Vector Laboratories
Weigerts Eisenhämatoxin	Merck
Xylol	Roth

2.3 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Alexa 549 Esel-anti-Ratte IgG	Molecular Probes
APC Hamster-anti-Maus CD11c IgG	BD Pharmingen
APC Hamster Isotyp IgG	BD Pharmingen
Biotin Ziege-anti-Maus IgG IgG	Abbiotec
PE Ratte-anti-Maus MHCII IgG	eBioscience
PE Ratte Isotyp IgG	eBioscience
Ratte-anti- Maus MBP IgG	Zur Verfügung gestellt von Dr. J.L. Mayo, Clinic Scottsdale, USA

2.4 Analysesysteme

Bezeichnung	Hersteller
RNase freie DNase Kit	Qiagen
ELISA Duo Set Maus IL-4	R&D Systems
ELISA Duo Set Maus IL-5	R&D Systems
ELISA Duo Set Maus IL-10	R&D Systems
ELISA Duo Set Maus TNF- α	R&D Systems
ELISA Duo Set Maus IFN- γ	R&D Systems
LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics
Omniscript RT Kit	Qiagen
OptEIA IgE ELISA	BD Bioscience
Pan T-Zell Isolations Kit	Miltenyi
RNeasy Minikit	Qiagen

2.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
ACT 8	Beckmann Coulter
Barometer	Dwyer Inst.
<i>Head out system</i> zur Messung der Lungenfunktion	Eigenbau FhG
Biophotometer	Eppendorf
Cell Sorter	BD Pharmingen
Cytospinzentrifuge Cytospin 3	Shandon
Digitalkamera	Kodak
Druckaufnehmer	Validyne Engineering
Dry Cal DC2	Bios International
Elektrophoresekammer	Serva
ELISA Reader	Dynatech
Fastprep	Thermo Electron
Halothanvernebler	Drägerwerk
Kryostat	Leica

Bezeichnung	Hersteller
Kühlzentrifuge	Thermo Electron
Lichtmikroskop	Zeiss
Lightcycler	Roche Diagnostics
Mikrowelle	Sharp
Pari Verneblungssystem LC Star	Pari
pH Meter	Neo Lab
Pipetten	Labsystems
Pneumotachograph	Hugo Sachs Electronics
Scantainer	Scanbur
Spannungsgenerator für Gelelektrophorese	Biorad
Thermocycler	Eppendorff
UV-Tisch	Herolab
Verstärker	Hugo Sachs Electronics
Waschautomat	Dynatech
Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorff

2.6 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Combitips	Eppendorff
Drei-Wege-Hahn	UNO Plast
Gewebekulturplatten (96 Well)	Nunc
Handschuhe (Latex)	Ansell
Handschuhe (Nitril)	Bestglove
Kanülen	Braun
LD Säulen für MACS	Miltenyi
LightCycler Kapillaren (20 µL)	Roche Diagnostics
LS Säulen für MACS	Miltenyi
Multitube Lagerungsboxen	Greiner
Objektträger	Menzel-Glaser
Pipettenfilterspitzen	Biozym
Pipettenspitzen	Brand

Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße (05 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	RD Bioscience
Spritzen (1 ml, 5 ml)	B.Braun
Transferringpipetten	Sarstedt
Venenverweilkanülen	Abbot

2.7 Puffer und Lösungen

Blockpuffer für ELISA Duo Set IFN- γ

Entsprechend der Bedieneranweisung: 1 % bovines Serumalbumin (BSA) in Phosphat gepufferter Saline (PBS).

Blockpuffer für OptEia IgE ELISA

1 % BSA in PBS. Entgegen der Bedieneranweisung wurde aufgrund der sofortigen Verwendung des Puffers auf die Zugabe von 0,05 % NaN_3 verzichtet.

Blockpuffer und Reaktionslösung für ELISA Duo Sets IL-4, IL-5, IL-10, Eotaxin-2 sowie Maxadilan und M65 spezifischen IgE und IgM Immunassay

Entsprechend der Bedieneranweisung: 1 % BSA in PBS, pH 7,2-7,4.

DNase-Mix

Der DNase-Puffer und die DNase wurden dem *RNase free DNase Set* (50) von Qiagen entnommen. 10 μl DNase wurden mit 90 μL DNase-Puffer versetzt.

ELISA Waschpuffer

Entsprechend der Bedieneranweisung: 0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4.

FACS Puffer

Entsprechend der Bedieneranweisung: 5 % Fötale Kälberserum (FCS) und 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS, steril filtriert.

Giemsa-Lösung

0,4 % (w/v) modifiziertes Giemsa in gepuffertem Methanol (pH 6,8). Die Giemsa-Lösung wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Vor Gebrauch wurde sie entsprechend der Bedieneranweisung 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend gefiltert.

Hämolysepuffer

150 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 und 0,1 mM Na_2EDTA in Aqua bidest., pH: 7,3.

LB 20 Puffer

Der LB-20 Puffer (LLC) wurde entsprechend der Bedieneranweisung 1:20 verdünnt in Aqua bidest. verwendet.

MACS Puffer

0,5 % BSA und 2 mM EDTA in PBS, steril filtriert.

May-Grünwald-Lösung

0,25 % (w/v) May-Grünwald in Methanol. Die May-Grünwald-Lösung wurde gebrauchsfertig von Sigma-Aldrich bezogen. Vor Gebrauch wurde sie steril filtriert.

PBS

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung wurde gebrauchsfertig von Cambrex bezogen.

Probenpuffer

Der Probenpuffer für die Gelelektrophorese wurde gebrauchsfertig von der Firma Promega bezogen.

Reaktionslösung für ELISA Duo Set IFN- γ

Entsprechend der Bedieneranweisung: 0,1 % BSA und 0,05 % Tween20 in Tris gepufferte Saline, pH 7,2-7,4.

Reaktionslösung für OptEia IgE ELISA

Entsprechend der Bedieneranweisung: 10 % FCS in PBS, pH 7,0.

TMB One (Tetramethylbenzidin)

Die Lösung enthielt 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin und stabilisiertes H₂O₂ und wurde gebrauchsfertig von Biotrend bezogen.

2.8 Medikamente**Bezeichnung**

Narcoren (Wirkstoff Pentobarbital-Natrium, 1,6 g/L)

Dexamethason (8 mg/ml)

Halothan (4 %, Exposition ca. 2 min)

Propofol

Hersteller

Merial

Ratiopharm

Sigma-Aldrich

B. Braun

2.9 Testsubstanzen

Maxadilan und M65 wurden mit freundlicher Unterstützung von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ethan Lerner von der Harvard Medical School, Boston, USA, zur Verfügung gestellt.

2.10 Gruppeneinteilung Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 426 weibliche BALB/cAnNCrI Mäuse. Bei Lieferung waren sie 8-10 Wochen alt und wogen durchschnittlich 18,5 g. Die Tiere wurden von Charles River bezogen. 48 Tiere wurden für die erste pharmakologische Studie in dem akuten Asthmodell verwendet und in eine Positivkontrollgruppe, eine Negativkontrollgruppe und eine Maxadilan behandelte Versuchsgruppe (n=16) eingeteilt (Tab. 1). In der zweiten pharmakologischen Studie in dem chronischen Asthmodell wurde 336 Tiere in 7 Gruppen aufgeteilt. Dabei wurde eine Negativ- und eine Positivkontrollgruppe, je eine sensibilisierte und eine nichtsensibilisierte Maxadilan und M65 behandelte Versuchsgruppe, sowie eine sensibilisierte Dexamethason behandelte Gruppe eingeteilt. In dieser Studie wurde ein chronisches Asthmodell verwendet, bei dem die Tiere an drei Zeitpunkten analysiert wurden. Zu jedem der drei Zeitpunkte wurden aus jeder der 7 Gruppen je 16 Tiere analysiert (Tab. 2).

42 Tiere wurden für die Etablierung von Methoden, die Dosisfindungen, sowie zur Gewinnung aufgereinigter Zellpopulationen für Expressionsanalysen verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlungen der akuten Maxadilan-Studie

Jede Gruppe umfasst eine Stärke von n=16 Tieren. NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, OVA= Ovalbumin

Gruppe	Sensibilisierung	Provokation	Behandlung
NEG	NaCl	OVA	NaCl i.n.
POS	OVA	OVA	NaCl i.n.
MAX	OVA	OVA	Maxadilan i.n.

Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlungen der chronischen Maxadilan-Studie

Jede Gruppe umfasst eine Stärke von n=48 Tieren, die in Gruppen zu je 16 Tieren an drei unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchsprotokolls (siehe Abb. 2) analysiert wurden. NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos = sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, OVA= Ovalbumin

Gruppe	Sensibilisierung	Provokation	Behandlung
NEG	NaCl	NaCl/OVA	NaCl i.n.
POS	OVA	OVA	NaCl i.n.
MAXneg	NaCl	NaCl/OVA	Maxadilan i.n.
MAXpos	OVA	OVA	Maxadilan i.n.
M65neg	NaCl	NaCl/OVA	M65 i.n.
M65pos	OVA	OVA	M65 i.n.
DEX	OVA	OVA	NaCl i.n. Dexamethason i.p.

2.11 Haltung der Versuchstiere

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz vom 25.05.98, geändert am 12.04.01, durchgeführt. Tierversuchsgenehmigungen lagen vor (33.42502-05/1021, 33.9-42502-04-07/1360). Die Versuchstiere wurden unter Standardhaltungsbedingungen des Tierhauses des Fraunhofer ITEM gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Nach sieben Tagen Akklimatisierung wurden die Tiere randomisiert. Pro Käfig wurden maximal 8 Tiere gehalten.

2.12 Versuchsprotokolle

In allen Modellen wurde als Modellallergen Ovalbumin (OVA) verwendet. Allen Tieren wurde eine Eingewöhnungsphase von mindestens 7 Tagen gewährt, bevor mit dem Versuchsprotokoll begonnen wurde. In einem akuten Modell durchliefen die Tiere eine Sensibilisierungsphase, in der sie mittels drei intraperitonealer (i.p.) Injektionen von jeweils 10 µg OVA grade VI (Sigma-Aldrich) mit 1,5 mg Alum injekt (40 mg/ml) in 200 µl Saline, auf das Modellallergen sensibilisiert wurden. Tiere der Negativkontrollgruppen erhielten Injektionen mit dem Vehikel, ohne OVA. Die Injektionen erfolgten an den Tagen 0, 14 und 21 der Versuche. Anschließend folgte eine *Challenge*-Phase, in der eine allergische Entzündungsreaktion in den Atemwegen mittels aerosolischer Allergenprovokation induziert wurde (Abb. 2).

Für die Allergenprovokationen wurde eine 1 % OVA Grade V Lösung in 0,9 % Natriumchloridlösung (NaCl) in einem Pari Vernebelungssystem aerosolisiert. Die Tiere wurden diesem Aerosol 20 min lang exponiert. Die Tiere wurden dazu einzeln in einer Expositions-kammer mit den Maßen 23 cm x 36 cm x 13 cm in durch Gitter getrennte Plätze gebracht. Die aerosolischen Allergenprovokationen wurden an den Versuchstagen 27 und 28 durchgeführt.

Am Tag 29 wurde bei allen Tieren der akuten Maxadilan-Studie unter Verwendung des akuten Modells eine Lungenfunktionsmessung unter Capsaicinprovokation zur Bestimmung der neuronalen Hyperreagibilität (NHR) und am Tag 30 eine Lungenfunktionsmessung unter Acetyl-β-methylcholinchlorid- (MCh) Provokation zur Bestimmung der AHR durchgeführt. Im Anschluss an die Messungen wurden die Tiere zur Probenentnahme und Analyse schmerzfrei getötet.

In dem chronischen Modell wurde die Sensibilisierung auf die gleiche Weise durchgeführt. Anschließend folgte eine Phase von 14 Wochen mit 2-mal wöchentlich und an konsekutiven Tagen stattfindenden aerosolischen Allergenprovokationen, beginnend an den Tagen 27 und 28 des Versuchs. Dabei wurden die Positivkontrollgruppen durchgehend mit OVA Aerosolen provoziert, während die Negativkontrollgruppen mit dem Vehikel ohne den Zusatz von OVA provoziert wurden, um eine Sensibilisierung über die Atemwege zu vermeiden. Nur die beiden finalen Aerosol Provokationen vor der jeweiligen Aufarbeitung wurden bei den Tieren der Negativkontrollgruppen mit dem Modellallergen durchgeführt. In diesem Modell wurden Tiere zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten des Protokolls analysiert: Nach 2 aerosolischen Provokationen am Tag 29, nach 8 Provokationen am Tag 50 und nach 28 Provokationen am Versuchstag 120. 24 Stunden nach den letzten Provokationen wurden Lungenfunktionsmessungen unter MCh-Provokation durchgeführt in deren Anschluss die Tiere zur Probenentnahme und Analyse schmerzfrei getötet wurden (Abb. 3).

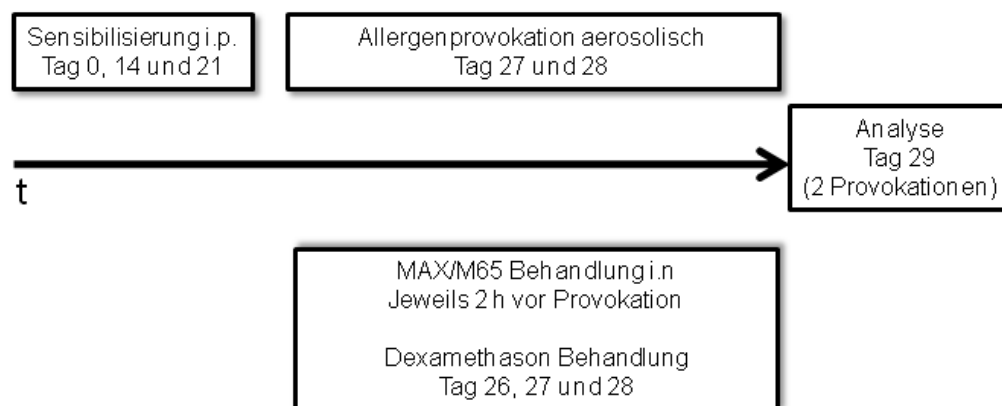


Abb. 2: Schematische Darstellung des verwendeten akuten Asthmaprotokolls. Die Tiere wurden an den Tagen 0, 14 und 21 mit dem Modellallergen OVA via i.p. Injektion sensibilisiert. Tiere der Negativkontrollgruppen erhielten i.p. Injektionen des Vehikels und wurden scheinensensibilisiert. An den Tagen 27 und 28 wurden die Tiere aller Gruppen mit einem 1 % OVA Aerosol 20 min provoziert. Behandlungen mit Maxadilan oder M65 erfolgten jeweils 2 h vor den aerosolischen Allergen Provokationen i.n. unter Halothan Narkose. Die Applikation von Dexamethason erfolgte 24 h und 1 h vor der ersten Allergen Provokationen und 1 h vor der zweiten Allergenprovokation. Am Tag 29 wurde mit der Messung der NHR und der weiteren Analyse begonnen.

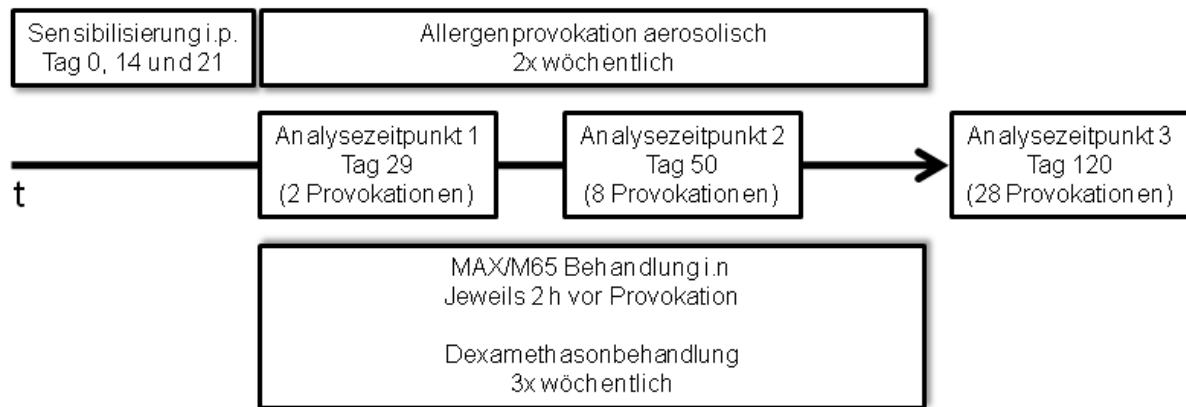


Abb. 3: Schematische Darstellung des verwendeten chronischen Asthmaprotokolls. Die Tiere wurden an den Tagen 0, 14 und 21 mit dem Modellallergen OVA via i.p. Injektion sensibilisiert. Tiere der Negativkontrollgruppen erhielten i.p. Injektionen des Vehikels und wurden scheinensensibilisiert. Anschließend folgte eine Phase von 14 Wochen, in der die Tiere 2-mal wöchentlich an aufeinander folgenden Tagen mit einem 1 % OVA Aerosol 20 min provoziert wurden. Negativkontrolltiere wurden, abgesehen von den 2 letzten aerosolischen Provokationen mit einer physiologischen NaCl Lösung provoziert. Die letzten beiden Provokationen erfolgten auch bei den Negativkontrolltieren mit dem Modellallergen OVA. Behandlungen mit Maxadilan oder M65 erfolgten jeweils 2 h vor den aerosolischen Allergen Provokationen i.n. unter Halothan Narkose. Die Applikation von Dexamethason erfolgte 24 h und 1 h vor der ersten wöchentlichen Allergen Provokation und 1 h vor der zweiten. Nach insgesamt 2, 8 und 28 Allergenprovokationen wurden je Gruppe 16 Tiere analysiert.

2.13 Behandlungen

Die Behandlung mit Maxadilan erfolgte in der akuten Maxadilan-Studie intratracheal (i.t.) am durch Halothan/Propofol sedierten Tier. Die Testsubstanz wurde über einen Tubus (Eigenanfertigung) direkt in die Bronchien appliziert. Da die Intubation einige Sekunden in Anspruch nimmt, erhielten die Tiere vor der Halothannarkose mit einem 4% Halothan-Luftgemisch 200 μ l einer Propofol/Saline Lösung 1:3 verdünnt i.p. injiziert (7 mg/kg Körpergewicht). Die narkotisierten Tiere wurden mit einem Gummiband am Oberkiefer auf einem Trapez fixiert. Mit einer Lampe wurde der Bereich des Pharynx von außen beleuchtet, wodurch der Eingang der Trachea im Rachen sichtbar wurde. Anschließend wurde intubiert

und es wurden 2,5 μg Maxadilan in 50 μl Saline instilliert. Die Applikation von Maxadilan erfolgte jeweils 2 Stunden vor den aerosolischen Allergenprovokationen.

In der chronischen Maxadilan-Studie wurde sowohl Maxadilan, als auch M65 verabreicht. Die Testsubstanzen wurden nicht i.t. sondern intranasal (i.n.) verabreicht, um Reizungen der Trachea bei vielfacher Applikation in der chronischen Studie zu vermeiden. Zuvor wurde mit dem Farbstoff Trypanblau eine Verteilung in die Atemwege i.n. verabreichter Flüssigkeiten in die Atemwege nachgewiesen. Zur i.n. Applikation wurden die Versuchstiere mit einem 4%igem Halothan/Luftgemisch in eine Kurznarkose versetzt, um den Schluckreflex zu unterdrücken und so ein Verschlucken der Testsubstanzen zu vermeiden. Anschließend wurden 2 μg Maxadilan oder 0,25 μg M65 in 50 μl Saline mit einer Pipette auf die Nasenöffnungen pipettiert und die Lösungen wurden inspiriert. Die Zeitpunkte der Applikation waren wie in der akuten Maxadilan-Studie jeweils 2 Stunden vor den Allergenprovokationen.

Dexamethason wurde in einer Dosis von 0,5 mg in 200 μl i.p. appliziert. Die Dexamethasongabe erfolgte dreimal wöchentlich: 24 h und 1 h vor der ersten Aerosolprovokation und 1 h vor der zweiten.

2.14 Dosisfindung

Für die Bestimmung der Dosen für Maxadilan und M65 wurde jeweils nach der höchsten Dosis gesucht, die für sich genommen nach Applikation an zwei aufeinander folgenden Tagen keine detektierbaren entzündlichen Prozesse in der Lunge hervorruft und keine Nebeneffekte induziert. Anhand von Literaturangaben (97, 98) wurde mit einer Dosis von 5 μg für Maxadilan begonnen. Die Gabe einer Dosis von 5 μg führte zu starken Nebenwirkungen, die starke, teilweise blutige Durchfallerscheinungen, struppiges Fell, Atemgeräusche, Flüssigkeitsansammlungen im Pharynx, Gewichtsverlust und teilweise apathisches Verhalten beinhalteten. Aufgrund dieser starken Beeinträchtigungen wurden im Folgenden niedrigere Dosen untersucht: 1 μg und 2,5 μg wurden an zwei konsekutiven Tagen verabreicht und die Tiere wurden unter Berücksichtigung der zuvor beobachteten Symptome an den Tagen der Applikation und 24 h nach der zweiten Applikation begutachtet. Bei keiner der geprüften Dosen konnten Nebenwirkungen festgestellt werden. Für die Hauptstudien wurde schließlich eine Dosis von 2 μg geplant um einen ausreichenden Puffer zu irritativen Konzentrationen zu gewährleisten. Zur Überprüfung von Maxadilan induzierten Immunantworten wurden 9 Tiere

in einer Vorstudie an zwei konsekutiven Tagen mit Maxadilan oder NaCl behandelt. Anschließend wurde der Immunstatus der Lunge anhand der bronchoalveolaren Flüssigkeit (BALF)-Zellen charakterisiert (Abb. 4). Lymphozyten und eosinophile Granulozyten waren in keiner der untersuchten BALF in erhöhtem Maße zu finden. Die Anteile der neutrophilen Granulozyten schwankten zwischen 0 % und 0,7 %, entsprechend schwankten die Anteile der Makrophagen zwischen 99,3 % und 100 %. Da in allen drei Gruppen vergleichbare Mengen an neutrophilen Granulozyten vorgefunden wurden und keine statistischen Unterschiede gefunden werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass die getesteten Dosen die Immunreaktion der Lunge nicht oder nur marginal beeinflussen. In den folgenden Hauptstudien wurden 2 μg Maxadilan in 50 μl Saline verabreicht.

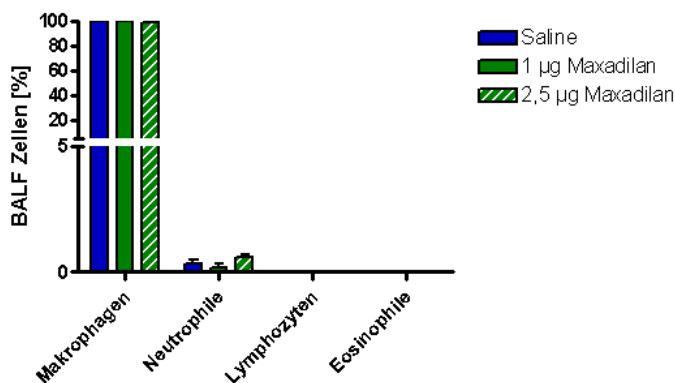


Abb. 4: Prozentuale Darstellung der BALF Zelldifferenzierung für die Maxadilan Dosisfindung. Es wurden Dosen von 1 μg und 2,5 μg Maxadilan getestet.

Da durch die Behandlung mit M65 proinflammatorische Effekte erwartet wurden, die unter Umständen durch eine LPS Kontamination der Testsubstanz hätte stark beeinflusst werden können, wurde eine Endotoxin Quantifizierung von M65 durch die Firma Lonza durchgeführt. Dabei wurde ein Endotoxingehalt von 2,14 EU/ml der Stocklösung detektiert, was einer Konzentration von etwa 432 EU bzw. 86 ng pro mg M65 entspricht, wenn von 5 EU pro 1 ng Endotoxin ausgegangen wird.

M65 wurde für die Dosisfindung zunächst in drei unterschiedlichen Dosen an je drei Tiere verabreicht. Bei der Dosis wurde sich an der Maxadilandosis orientiert und es wurden 5 μg , 2 μg und 0,5 μg intranasal verabreicht. Die Applikationen erfolgten ebenfalls an zwei konsekutiven Tagen. 6 Stunden nach der zweiten Applikation wurden die Tiere getötet und die Lunge lavagiert. Die Zelldifferenzierung der BALF Zellen wurde als Hauptparameter für die Bestimmung der M65 Dosis verwendet. In der ersten Dosisfindung induzierten alle

getesteten Dosen einen Influx von neutrophilen Granulozyten (Abb. 5A). Bei einem zweiten Ansatz wurden geringere Dosen getestet: 0,25 μg , 0,05 μg und 0,1 μg . Keine der Dosen wies eine signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten in der BALF auf. Die höchste Dosis, bei der kein signifikanter Anstieg inflammatorischer Zellen in der BALF feststellbar war, betrug 0,25 mg M65 (Abb.5B). Bei dieser M65 Dosis wurde eine sehr geringe LPS Dosis von etwa 22 pg verabreicht. Die Gefahr LPS induzierter Effekte war demzufolge gering. Für die Hauptstudien wurde eine Dosis von 0,25 mg M65 verwendet.

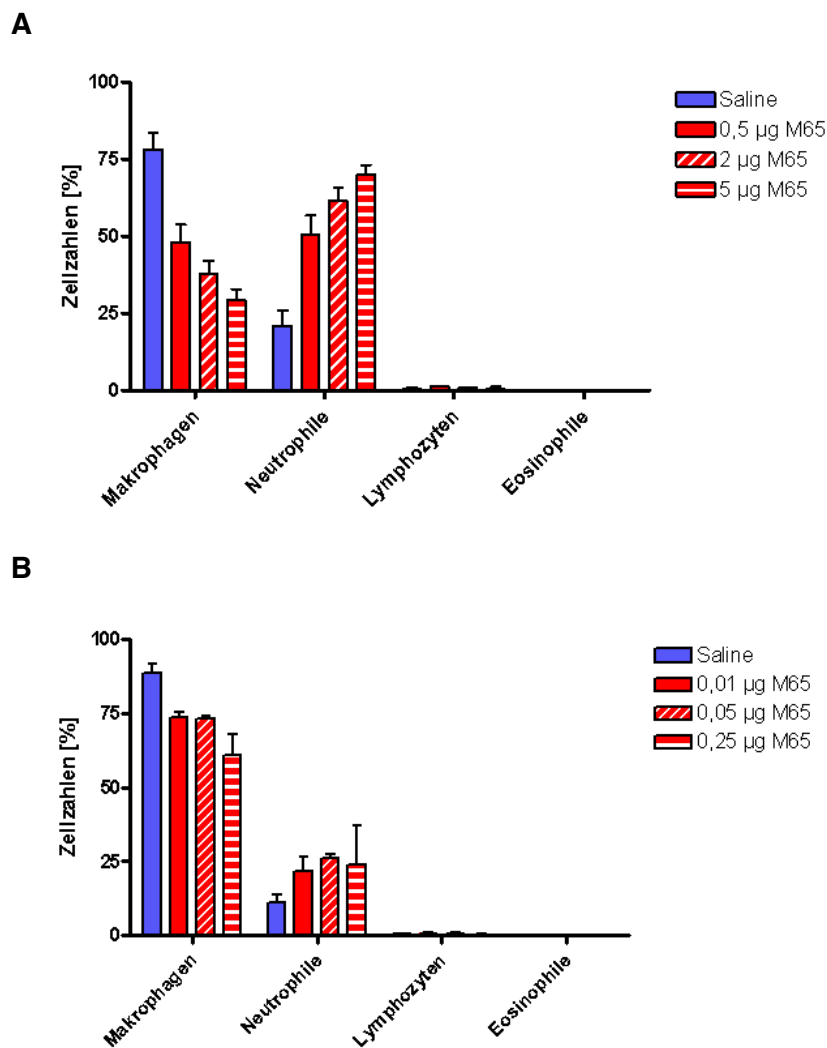


Abb 5: Prozentuale Darstellung der BALF Zelldifferenzierung für die M65 Dosisfindung. Es wurden Dosen von **A** 5 μg - 0,5 μg und **B** 0,25- 0,05 μg .

2.15 Analyse der Atemwegshyperreagibilität

Zur Bestimmung der AHR wurde die Lungenfunktion der Tiere im *Head-Out*-System 24h nach der letzten Allergenprovokation bodyplethysmographisch unter Verwendung des Mess- Auswertesystems Hem 3.4 der Firma Notocord gemessen (Abb. 6). Die Bestimmung der verabreichten MCh-Dosis erfolgte mit Hilfe einer zuvor durchgeführten Gravimetrie. Dabei wurde im Aerosolgenerator unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen MCh Konzentrationen wie bei der späteren Messung MCh aerosolisiert. Die Plethysmographen wurden mit einem Filter versehen, durch den das Aerosol mit einer Geschwindigkeit von 0,9 L/min geleitet wurde. Das MCh blieb bei diesem Vorgang am Filter haften. Nach der Aerosolisierung jeder MCh-Konzentration wurde der Filter gewechselt und der Aerosolgenerator gespült. Durch anschließendes Wiegen der getrockneten Filter auf einer Analysenwaage konnte auf die MCh-Menge, die bei der Aerosolbildung jeder Konzentration in der Lunge der Mäuse deponiert wird, rückgeschlossen werden (99).

Die Expositionszeit der einzelnen aerosolisierten MCh-Konzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle (physiologische NaCl-Lösung) betrug jeweils 60 s. Der Zeitraum zwischen den einzelnen Verneblungsstufen betrug mindestens 3 min, oder bis zum deutlichen Abklingen der lungenphysiologischen Reaktion auf den MCh-Reiz. Es wurden die Konzentrationsstufen 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0 und 40,0 mg/ml MCh eingesetzt. Als Parameter für eine Bronchokonstriktion wurde die EF50 (Expiratorischer Fluss bei halbmaximalem Expirationsvolumen (100)) benutzt. Beim Erreichen eines Abfalls der EF50 um mindestens 50% vom Basalwert oder nach der Aerosolisierung der höchsten MCh-Konzentration wurde der Provokationstest beendet.

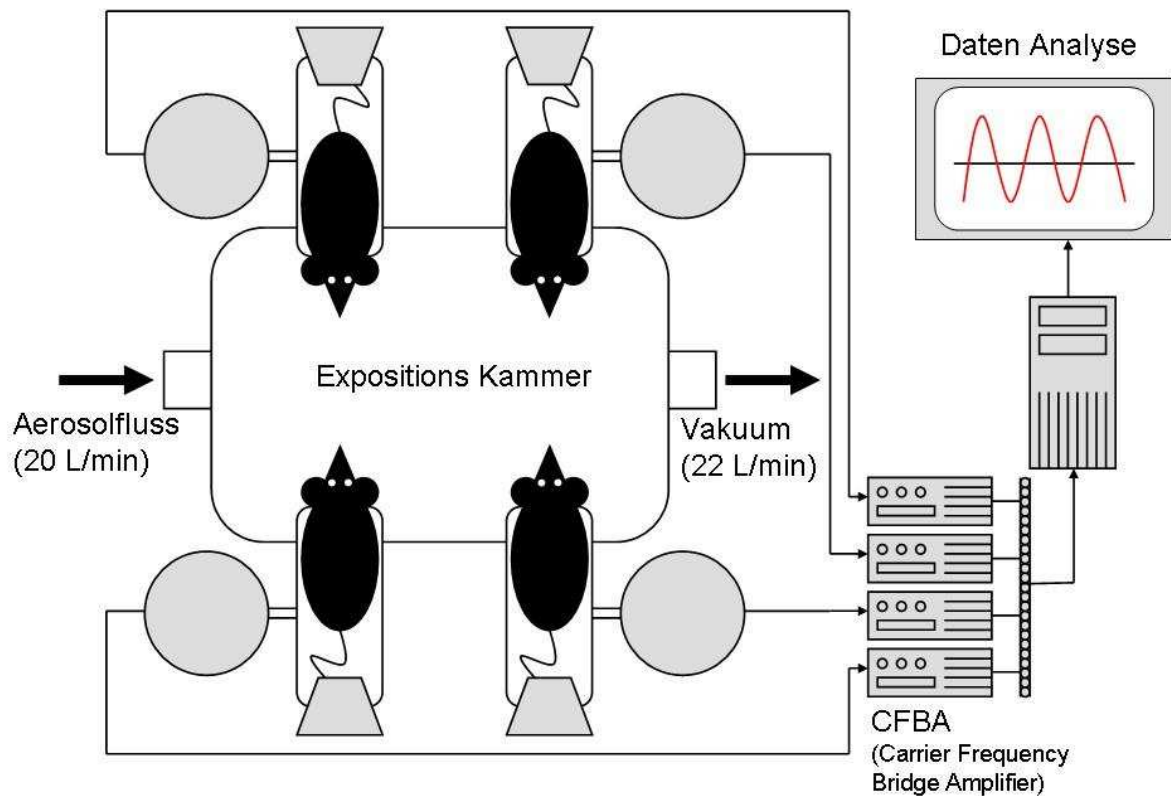


Abb. 6: Schematische Darstellung des Head-Out-Body-Plethysmograph Messplatzes; Die Tiere sind mittels eines Latexkragen in den vier Plethysmographen fixiert und die Köpfe der Tiere werden in einer Expositions-kammer einem MCh-Aerosol exponiert. Die durch die Atmung der Tiere verdrängte Luft in den Plethysmographen wird in den Druckaufnehmern detektiert und das Signal wird an die Verstärker weitergeleitet. Diese sind mit einer Computer gestützten Auswertestation verbunden, an der der Midexpiratory Flow angezeigt wird. Die Konstanz des Aerosolflusses wurde mit einem Flussmessgerät (DryCal) überprüft.

Aus den Messdaten der EF50 wurde für jedes Tier eine sigmoidale Dosiswirkungskurve erstellt, die sich auf die kumulative individuelle MCh-Dosis bezog. Anhand der Funktionen wurde für jedes Tier die Effektive Dosis 50 (ED50) bestimmt. Die ED50 entspricht der MCh-Konzentration, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen zu einem Abfall der EF50 um 50 % führte.

2.16 Analyse der neuronalen Hyperreagibilität

Analog zur MCh-Aerosolisierung bei der Messung der AHR wurde in der ersten Studie zusätzlich eine Lungenfunktionsmessung unter Capsaicinprovokation zur Bestimmung der neuronalen Hyperreagibilität (NHR) durchgeführt. Capsaicin wurde ursprünglich aus Chili Schoten isoliert und als die Substanz identifiziert, die für die Schärfe von Chili verantwortlich ist. Capsaicin aktiviert *transient receptor potential vanilloid receptor 1* (TRPV1) sensibler Nerven in der Lunge. Eine Aktivierung nach Aerosolisierung hat beim Menschen einen starken Hustenreiz und eine Bronchokonstriktion zur Folge (101). In der Maus wurde als eine der deutlichsten Reaktionen auf eine inhalative Capsaicin Provokation eine Pause zwischen der Inspiration und der Expiration beobachtet (102), die als *Time of breaking* (TB) bezeichnet wird und sich dosisabhängig verlängert. Im Gegensatz zum MCh, das direkt konstriktorisch auf die Atemmuskulatur wirkt, wird die Reaktion auf Capsaicin zum einen über zentrale Nervenreflexe und zum anderen über die lokale Freisetzung von Mediatoren wie Neuropeptiden aus den Nerven gesteuert. TB wird in den Versuchen der akuten Maxadilan-Studie als Parameter für die Erfassung der NHR gemessen. Damit soll geklärt werden, ob der PAC1 Rezeptor und die endogenen Liganden VIP und PACAP, deren Expression in pulmonalen cholinergen Nervenfasern nachgewiesen wurde (84, 103), in die neuronale Hyperreagibilität involviert sind. Capsaicin hat als Alkaloid hydrophobe Eigenschaften und löst sich daher nicht in Wasser. Zur Herstellung von Capsaicinlösungen wurden daher Saline mit 10 % Ethanol verwendet.

In dem Versuch wurden aufgrund von Erfahrungswerten innerhalb der Arbeitsgruppe folgende Ansätze aerosolisiert: Saline als Basalwert, Saline mit 10% Ethanol als Vehikelkontrolle, 10 $\mu\text{g/ml}$ Capsaicin, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$.

2.17 Analyse

Im Anschluss an die Messung der AHR wurden die Tiere durch die Verabreichung einer Überdosis Narcorens (0,3 ml einer 320 mg/ml Lösung) für die anschließende Probenentnahme getötet. Sofort nach Eintritt des Todes wurde das Abdomen eröffnet und die *Vena cava* punktiert, aus der 0,3 bis 0,4 ml Blut mit einer mit 50 μl EDTA befüllten 1 ml Spritze abgenommen wurden. Das gewonnene Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert.

Das Pellet wurde verworfen.

Anschließend wurde die Trachea freigelegt. Im Bereich unterhalb des Kehlkopfs wurde eine Venenverweilkanüle in die Trachea eingeführt, über die die Lunge 2-mal mit 0,8 ml eisgekühlter Saline lavagiert wurde. Die gewonnene bronchoalveolare Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde in ein 5 ml Flacon Röhrchen überführt und für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 250 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die zellulären Rückstände wurden in 500 μ l PBS resuspendiert und am ACT 8 gezählt. Bis zur Anfertigung der Zytospots wurden die Zellen auf Eis gehalten.

Der rechte Lungenflügel wurde mit einer Klemme am Bronchus abgeklemmt. Der linke Lungenflügel wurde entweder über die Venenverweilkanüle mit 1:3 mit Saline verdünntem *optimal cutting temperature compound* (OCT) befüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, oder mit 4 % iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung befüllt und in 4 % PFA-Lösung in einem 50 ml Falcon Röhrchen bei Raumtemperatur gelagert. Der rechte Lungenflügel wurde herauspräpariert und unbefüllt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die rechten Lungenflügel wurden ebenfalls bei -80°C gelagert. Bei der Hälfte der Tiere der chronischen Studie wurden die Lungenflügel nicht befüllt sondern entnommen und in eisgekühltes Medium in einer Petrischale überführt und für die DC-Isolation bereit gehalten.

2.18 Isolation pulmonaler DC und Makrophagen

2.18.1 Gewebeaufschluss

Prinzip:

Zur Isolation pulmonaler DC und Makrophagen werden die Lungen zunächst durch mechanisches Zerkleinern und anschließend enzymatisch aufgeschlossen. Durch den Verdau mit Collagenase wird die extrazelluläre Matrix aufgeschlossen und durch die Verwendung von DNase wird durch den mechanischen Aufschluss freigesetzte Desoxyribonukleinsäure (DNA) verdaut und so die Bildung von Zellakkumulationen reduziert. Der Verdau wird durch die Zugabe von EDTA gestoppt. Anschließend wurde eine Hämolyse durchgeführt um Erythrozyten zu entfernen.

Durchführung:

Die aus den Mäusen entnommenen Lungen wurden mit Schere und Skalpell zu einer homogenen Masse zerkleinert und anschließend in 6 ml RPMI Medium aufgenommen. Das Gewebe wurde nach Zugabe von 1 ml einer 0,1 % DNase und 1 mg/ml Collagenase Lösung 40 min bei 37 °C und auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit einer Transferpipette durchmischt. Das zerkleinerte Gewebe wurde mit 600 µl 0,1 molarer EDTA Lösung versetzt und weitere 5 min mit der Transferpipette durchmischt um den Verdau durch die DNase und Collagenase abzustoppen. Anschließend wurde das Gewebe gesiebt um größere Gewebestücke zu entfernen. Mit diesem Schritt wurden annähernd alle Zellaggregate entfernt und es lag eine Einzelzellsuspension vor. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 10 min wurde der Überstand verworfen und eine Hämolyse durchgeführt. Dafür wurde das Pellet für 10 min in Hämolysepuffer aufgenommen. Die Hämolyse wurde durch die Zugabe von 9 ml RPMI Medium abgestoppt und es wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellzahlen bestimmt.

2.18.2 MACS Isolation*Prinzip:*

Die Zellaufreinigung mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS) ist ein Verfahren zur Isolation von Zellpopulationen aus einer Zellsuspension über spezifische Oberflächenmoleküle. Oberflächenmoleküle werden von magnetischen *Bead* markierten Antikörpern spezifisch gebunden. Zellen, welche diese Moleküle exprimieren, können aufgrund der gebundenen *Beads* in einem magnetischen Feld gehalten werden. Wird die Zellsuspension nach der Bindung der Antikörper durch eine Säule in ein magnetisches Feld gegeben, können unmarkierte Zellen die Säule ungehindert passieren, während markierte Zellen in der Säule gehalten werden. Nachdem die unmarkierten Zellen aus der Säule gewaschen wurden wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und über einem Sammelgefäß gespült. Die markierten Zellen werden nun ungehindert aus der Säule gespült und in einem Sammelgefäß aufgenommen. Dabei können je nach Verwendungszweck entweder die markierten Zellen unter Verwendung von LS Säulen gesammelt werden oder unter Verwendung von LD Säulen die nicht markierten.

Durchführung:

Im nächsten Schritt wurden mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS) CD11c positive Zellen aus der Zellsuspension aufgereinigt. In der Peripherie wird CD11c vor allem auf DC und Makrophagen exprimiert, aber auch auf anderen Zellen des Immunsystems wie beispielsweise NK-Zellen. Eine Differenzierung einzelner Zellpopulationen wird im nächsten Schritt, dem *Cell Sort* durchgeführt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 400 μ l MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l CD11c spezifische *Microbeads* (Miltenyi) pro $1 \cdot 10^8$ Zellen in die Suspension gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen gewaschen. Es wurde mit 200 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml MACS Puffer resuspendiert. Nun wurden LS-Säulen (Miltenyi) in das magnetische Feld gegeben und mit MACS Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Es wurde mit drei mal 3 ml MACS Puffer gewaschen und der komplette Durchfluss verworfen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld genommen und die CD11c positiven Zellen mit 5 ml MACS Puffer eluiert und in einem neuen Gefäß gesammelt.

2.18.3 Fluoreszenzzytometrische Zellsortierung

Prinzip:

Der *Cell Sort* ist ein Fluoreszenz basiertes Verfahren zur Isolation und Aufreinigung einzelner Zellpopulationen in einer Zellsuspension. Dabei werden Zellen einer Suspension einzeln über eine Kapillare in das System gesogen und an verschiedenen Lasern vorbeigeleitet. Bei diesem Vorgang werden das Licht, welches die Zelle ungehindert passiert, das Streulicht und emittiertes Licht durch Fluoreszenzfarbstoffe detektiert und können am Bildschirm dargestellt werden. Durch diese Messungen lassen sich Zellgröße, Granularität und Fluoreszenzintensität und somit indirekt die Expression der Antikörperepitope bestimmen. Durch *Gaten* einzelner Populationen anhand dieser Parameter können unterschiedliche Zelltypen definiert werden. Die Zellen werden nach der Laserbestrahlung in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl aus dem System entfernt. Dieser Strahl trennt sich in einzelne Tropfen auf, wobei sich in jedem Tropfen maximal eine Zelle befindet. Einzelne Tropfen können in einem starken elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden abgelenkt und so in verschiedene Behältnisse überführt werden. Es können ca. 3000 Zellen pro Sekunde effizient zugeordnet werden.

Durchführung:

Die Zellen der Suspension wurden mit zwei Antikörpern gefärbt. Mit einem Allophycocyanin (APC) markierten Antikörper gegen CD11c und einem Phycoerythrin (PE) markierten Antikörper gegen MHC II. Dafür wurden die Zellen eines jeden Tieres in 4 Aliquots geteilt. Ein Aliquot wurde für die MHC II und CD11c Doppelfärbung genutzt, zwei für die jeweiligen Einzelfärbungen, um eine Kompensation der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe zu ermöglichen und das vierte Aliquot wurde für die Isotypfärbung verwendet, um die Spezifität der Färbung nachzuweisen. Zunächst wurden alle Aliquots bei 300 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle Aliquots wurden mit 25 μ l einer 1:25 in *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) Puffer verdünnten Goat-Serum Lösung geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils 1 μ l der konzentrierten Antikörperlösung im Falle aller PE markierten Antikörper und mit 2 μ l im Falle der APC markierten Antikörper beschickt. Die Röhrchen wurden mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 500 μ l FACS Puffer resuspendiert.

Nach der Färbung wurden die Zellen im FACS Aria nach DC und Makrophagen getrennt. Nach automatischer Kompensation mit der FACS Diva Software wurden CD11c positive und MHC II stark positive Zellen als DC definiert und CD11c positive und MHC II schwach positive Zellen als Makrophagen. Makrophagen und DC wurde in getrennten Gefäßen gesammelt. Alle übrigen Zellen wurden verworfen. Makrophagen und DC wurden mit Reinheit von über 94 % nach Reanalyse als ausreichend sauber befunden. Die Zellen wurden nach der Isolation für 10 min bei 300g zentrifugiert und in 300 μ l RLT Puffer aufgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2.19 Isolation naiver T-Zellen

2.19.1 Gewebeaufschluss

T-Zellen wurden aus den Milzen naiver Mäuse gewonnen. Dazu wurden Tiere schmerzfrei mit einer Überdosis Narcoren getötet. Die Milzen wurden entnommen und wie unter 2.18.1 beschrieben mechanisch aufgeschlossen.

2.19.2 MACS Isolation

Prinzip:

Anschließend eine Aufreinigung von T-Zellen mit dem *Pan-T-cell isolation kit* entsprechend der Bedienungsanweisung des Herstellers durchgeführt. Im Kit wird dafür ein Cocktail CD45R, CD49b, CD11b und Ter-119 spezifischer biotinylierter Antikörper verwendet, die mit Biotin spezifischen *Microbead* markierten Antikörpern gebunden werden. Damit werden weitgehend alle Zellen, die keine T-Zellen sind gebunden und T-Zellen können ohne, dass sie Antikörper gebunden haben nach dem unter 5.19.2 beschriebenen Prinzip aus einer Zellsuspension isoliert werden.

Durchführung:

Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 400 μ l MACS Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l des Antikörpercocktails aus dem *Pan T-cell isolation kit* pro $1 \cdot 10^8$ Zellen in die Suspension gegeben. Nach einer 15 minütigen Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml MACS Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen gewaschen. Es wurde mit 300 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 2 ml MACS Puffer resuspendiert. Nun wurden LD-Säulen in das magnetische Feld gegeben und mit MACS Puffer gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die Zellen, die die Säule ungehindert durchliefen, wurden in einem Sammelgefäß aufgefangen. Es wurde mit drei mal 3 ml MACS Puffer gewaschen. Die in dem Sammelgefäß befindlichen aufgereinigten T-Zellen wurden mit 300 g für 10 min zentrifugiert und in 300 μ l RLT Puffer aufgenommen. Die T-Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung in der *polymerase chain reaction* (PCR) bei -80 °C gelagert. Die Säulen mit den darin befindlichen Zellen wurden verworfen.

2.20 Quantitative PCR

2.20.1 RNA-Isolation

Prinzip:

In einem stark denaturierenden Lysis-Puffer, der β -Mercaptoethanol enthält, wird biologisches Probenmaterial im Fastprep homogenisiert. Das Homogenat wird mit Ethanol konditioniert und auf eine Säule gegeben. Die Säule enthält eine Membran, die zum größten

Teil aus einem Silikat-Gel besteht, an die Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküle einer Mindestgröße von 200 Basen effektiv binden. In mehreren Zentrifugationsschritten werden Kontaminationen gewaschen und die RNA anschließend mit Aqua bidest. eluiert. Der RNA-Gehalt des Eluats wird photometrisch bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 resultierend aus der Messung bei 260 nm entspricht dabei empirisch einer Konzentration von 40 µg/ml.

Durchführung:

Die RNA-Isolierung wurde nach dem Protokoll des RNeasy Minikits durchgeführt. Die Aufarbeitung isolierter Zellen (DC, Makrophagen und T-Zellen) erfolgte nach dem Herstellerprotokoll für Zellsuspensionen. Die Probenvorbereitung von Lungengewebe wurde wie nachfolgend variiert. Ein Lungenflügel wurde in 1 ml RLT+Mercaptoethanol (10 µl/ml RLT) im Fastprep für 2 * 30 s auf Stufe 4 homogenisiert. 100 µl des Homogenats wurden mit 400 µl RLT-Puffer und 500 µl Ethanol 70 % versetzt. Die vollständige Lyse des Gewebes war bei dieser RNA-Isolierungstechnik, die auf einer Trennung über die Passage durch eine Mikromembran basiert, der limitierende Faktor für die RNA-Ausbeute. Die Flüssigkeit wurde in zwei Schritten auf die Membransäule gegeben. Alle folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und 16100 g.

Das Sammelgefäß mit der Membransäule wurde nach jeder Zugebe von 500 µl 30 s zentrifugiert und die im Sammelgefäß enthaltene Flüssigkeit verworfen. Anschließend wurde zunächst mit 700 µl RW1-Puffer und danach mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach Zugabe der Puffer wurde erneut für je 30 s zentrifugiert und die angesammelte Flüssigkeit verworfen. Nun wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Membran gegeben. Anschließend wurde für 2 min zentrifugiert, die Säule in ein sauberes Sammelgefäß überführt und erneut 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß mit Deckel überführt und es wurden 60 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, wodurch an die Membran gebundene RNA eluiert wurde. Die im Wasser gelöste RNA wurde durch Zentrifugation für 1 min bei 9300 g in das Sammelgefäß gebracht.

2.20.2 DNA-Verdau

Um eine Verunreinigung der isolierten RNA durch DNA zu minimieren, wurde die Probe wie im Folgenden beschrieben einem DNA-Verdau unterzogen. Es wurden 10 µl der RNase-freien DNase I Lösung mit 70 µl RD-Puffer versetzt, mit 60 µl Eluat vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl RLT-Puffer und 350 µl Ethanol 70% zugegeben und die Probe auf eine neue Säule gegeben. Die RNA-Isolierung wurde wie unter 2.20.1 beschrieben wiederholt.

2.20.3 Reverse Transkription

Prinzip:

Für die Amplifizierung der isolierten RNA mittels PCR ist es notwendig, diese in DNA umzuschreiben. Diese der RNA komplementäre cDNA wird durch reverse Transkription durch das Enzym RNA-abhängige reverse Transkriptase gewonnen. Die isolierte RNA wird mit dem Enzym unter katalytischen Bedingungen und Zugabe eines Random-Primers inkubiert. Die gewonnene cDNA kann anschließend für die Real-Time-PCR verwendet werden.

Reverse Transkriptase wird in der Natur von Retroviren benutzt, um die im Virus als RNA vorliegende genetische Information in DNA zu transkribieren.

Durchführung:

0,6 µg/ml der aus dem Lungengewebe gewonnenen RNA oder 25,5 µl der konzentrierten RNA aus den isolierten Zellpopulationen wurden mit Omniscript nach Anleitung des Kits im 40 µl Ansatz in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die *Template* RNA auf 25,5 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und bei 65 °C für 5 min denaturiert. Nach dem Erkalten der Lösung wurden je 4 µl 10x Puffer, Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP)-Mix und *Oligo-dt-Primer*, 0,5 µl RNaseinhibitor und 2 µl Omniscript RS beigefügt. Es wurde anschließend für 90 min bei 37 °C umgeschrieben und für 5 min bei 95 °C inaktiviert. Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

2.20.4 Real-Time PCR

Prinzip:

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA. Zur Reaktion wird die DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq) verwendet.

Die Taq Polymerase zeichnet sich durch hohe Hitzeresistenz aus und wird auch bei Temperaturen um 100 °C nicht denaturiert. Daher ist es möglich, das PCR-Reaktionsgemisch auf 95 °C zu erhitzen, um eine Denaturierung der DNA zu erreichen, ohne die Polymerase zu inaktivieren. Dem Reaktionsmix werden neben Puffer und Polymerase *Primer* und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) beigelegt. *Primer* sind 18-24 Basenpaar (bp) große *single stranded* DNA-Moleküle, die nach dem Abkühlen auf 68 °C an komplementäre Sequenzen binden und so an der Ausbildung kurzer doppelsträngiger Sequenzen beteiligt sind, die der Polymerase als Startsequenzen dienen. Die anschließende Elongation der Gen-Fragmente mit dNTPs durch die Polymerase findet bei 72 °C statt. Der Zyklus aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation wird 45-mal wiederholt, wobei der DNA-Gehalt exponentiell ansteigt bis eine Sättigung erreicht wird.

Als Besonderheit der *Real-Time* PCR kann die Konzentration der gebildeten DNA nach jedem Zyklus erfasst werden. Die für die *Real-Time* PCR verwendeten dNTPs haben einen Fluoreszenzfarbstoff und einen *Quencher* gebunden. Der Fluoreszenzfarbstoff kann durch vom *Light-Cycler* ausgesendetes Licht spezifischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Im gebundenen Zustand wird das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht jedoch vom *Quencher* absorbiert. Durch die Bindung der dNTPs an *single stranded* DNA-Moleküle wird der *Quencher* vom Fluoreszenzfarbstoff getrennt.

Aufgrund der daraus resultierenden höheren Distanz zwischen Fluoreszenzfarbstoff und *Quencher* wird das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht nicht mehr vom *Quencher* absorbiert und kann vom *Light-Cycler* detektiert werden. Die Konzentration freien Fluoreszenzfarbstoffs korreliert mit der Menge verbrauchten dNTPs und somit mit dem DNA-Gehalt. Deshalb kann anhand der Menge des vom Fluoreszenzfarbstoff abgegebenen Lichts nach jedem Zyklus der DNA-Gehalt der Lösung quantitativ erfasst werden.

Für jedes gewünschte Produkt werden Standardkurven generiert, um eine quantitative Aussage treffen zu können. Proben aus diesen Standardkurven laufen als Referenz in jeder PCR mit, um dann mit dem Programm RelQuant in Relation zur Standardkurve, Produktreferenz und zum *housekeeping-gene*-Standard das normalisierte Verhältnis an

Produkt-DNA in der Probe zu berechnen.

Ein *housekeeping-gene* stellt eine Referenz dar, mit der die Zielgene zwecks Quantifizierung in Relation gesetzt werden. Daher sollte es stets in gleich bleibender Stärke transkribiert werden. Als *housekeeping-gene* wurde die Porphobilinogendeaminase (PBGD) gewählt. Sie ist ein Schlüsselenzym bei der Synthese von Tetrapyrrolen wie Hämoglobin und Chlorophyll und ubiquitär vorhanden.

Durchführung:

Die PCR wurde mit einem *LightCycler* (Roche) in 20 µl *LightCycler* Kapillaren (Roche) durchgeführt. Hierbei wurde das *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I*-Kit (Roche) nach Anleitung verwendet.

Temperaturzyklen der PCR:

- | | | | |
|--------------------------------|-------------------|---------|--------|
| 1.) <i>Hot Start:</i> | Schmelzen der DNA | 95°C | 10 min |
| 2.) Amplifikation, 45 Zyklen: | | | |
| | Denaturierung | 94°C | 1 sek |
| | Annealing | 68°C | 10 sek |
| | Elongation | 72°C | 9 sek |
| 3.) Erstellen der Schmelzkurve | | 95-60°C | |

2.20.5 Primersequenzen und Amplifikate

Die *Primer* wurden so synthetisiert, dass sie eine Länge von 18-24 bp aufwiesen, Eigenkomplementarität, Palindrome und repetitive Sequenzen nach Möglichkeit vermieden wurden, der GC-Gehalt und der Schmelzpunkt bei beiden Primern ähnlich war und die Amplifikatgröße bei ca. 100-250 bp lag. Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden in den mit NCBI Blast ermittelt. Die *Primer* wurden so gewählt, dass die amplifizierten Genfragmente Intron-überspannende Bereiche enthalten, um anhand der Amplifikatgröße genomische DNA von cDNA unterscheiden zu können. Die *Primer* wurden mit Hilfe des Programms *Primer3* entworfen und von der Firma MWG synthetisiert.

Sequenzen:

PBGD

Sense: ATCCAGGTCCCTGTTTCAGCAAGAA

Antisense: CATTAAGCTGCCGTGCAACATCCA

Amplifikatlänge: 181 bp

PAC1

Sense: CATAGGGGATTCTGGCTTTG

Antisense: GCCTTCACCGACAGGTAGTAA

Amplifikatlänge: 183 bp

VPAC1

Sense: ATTGAGAAACAGCGTCAGCA

Antisense: CGTGAATGGGGGAAAACA

Amplifikatlänge: 165 bp

VPAC2

Sense: TGGACAGCAACTCGCCTCTCTTTA

Antisense: TACTGTGACTGGTCATTGCCACCA

Amplifikatlänge: 194 bp

Die Amplifikatgröße wurde mittels Gelelektrophorese ermittelt und mit der erwarteten Produktgröße verglichen. Die Amplifikationsprodukte wurden durch die Firma GATC Biotech sequenziert und die Produktsequenz in NCBI Blast gegeben. Dabei wurde die ermittelte Produktsequenz mit publizierten Sequenzen verglichen und die Referenzsequenzen ermittelt, die die größten Übereinstimmungen mit dem eigenen Produkt zeigten. Sämtliche Produkte konnten sowohl elektrophoretisch als auch durch Sequenzabgleich verifiziert werden.

2.20.6 Gel-Elektrophorese

Prinzip:

Mit Hilfe der Elektrophorese lassen sich Proteine und andere Makromoleküle wie RNA und DNA nach ihren Größen- und Ladungsverhältnissen auftrennen. Möglich wird diese Trennung durch das Wanderverhalten von Molekülen mit einer Nettoladung im elektrischen Feld.

$$v = \frac{Ez}{f}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit v des Moleküls im elektrischen Feld hängt von der elektrischen Feldstärke E , der Nettoladung des Moleküls z und dem Reibungskoeffizienten f ab. Der elektrischen Kraft Ez , die das geladene Molekül zur entgegengesetzt geladenen Elektrode treibt, wirkt die Reibungskraft entgegen, die zwischen dem wandernden Molekül und dem Medium entsteht. Der Reibungskoeffizient f hängt sowohl von der Masse und Gestalt des wandernden Moleküls als auch von der Viskosität des Mediums ab. Je größer das Molekül und je größer die Viskosität des Mediums, desto kleiner ist die Wanderungsgeschwindigkeit. Die Maschenweite des Polymers kann bei Agarosegelen durch die Konzentration der eingesetzten Agarose reguliert werden. In diesem Projekt wurde mit 1,5 %igen Agarosegelen gearbeitet.

Die Darstellung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit Ethidiumbromid. Ethidiumbromid besitzt eine ähnliche Struktur wie zwei gepaarte Basen und kann daher im DNA-Gerüst interkalieren. Unter UV-Licht fluoresziert das Ethidiumbromid und macht noch Banden sichtbar, die weniger als 50 ng DNA enthalten.

Durchführung:

Es wurden 150 ml 1,5%ige Agarose in LB-Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 6 µl Ethidiumbromid zugegeben. 150 ml der mit Ethidiumbromid versetzten Agaroselösung wurden in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Der Teflon-Probenkamm wurde eingesetzt. Das ca. 5 mm dicke Gel wurde nach dem Erstarren in der Elektrophoresekammer mit LB-Puffer überschichtet und der Teflon-Probenkamm wurde wieder entnommen. Anschließend wurden 20 µl der PCR-Produkte aus den Kapillaren durch kurzes Anzentrifugieren in 1,5 ml Eppendorf Gefäße gebracht und mit 4 µl Probenpuffer

versetzt. Ein Volumen zwischen 3 μl und 20 μl dieser Lösung wurde auf das Gel aufgetragen. Zur Einschätzung der Länge der PCR-Produkte wurde zusätzlich eine separate Tasche mit 6 μl eines 100 bp DNA-*Ladder* befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 250 mA. Anschließend wurde das Gel unter UV-Anregung fotografiert.

2.21 ELISA

Prinzip:

Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nutzt die Bindungsspezifität von Antikörpern zum quantitativen Nachweis eines Antigens in einer Probe. Hierzu wird ein antigenspezifischer Primärantikörper im Überschuss unspezifisch an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. Das in der Probe enthaltene Antigen wird spezifisch vom Primärantikörper gebunden und kann mit einem zweiten, Biotin-gekoppelten Antikörper, dem sogenannten Detektionsantikörper, markiert werden. Die Antikörperbindung wird beim ELISA mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen, indem dem Ansatz Streptavidin-gekoppelte *horseradish peroxidase* (HRP) zugesetzt wird. Streptavidin bindet an das Biotin der Präzipitate. Als Farbsubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) zugegeben und durch die HRP umgesetzt. Die Lösung verfärbt sich. Auch kleine Enzymmengen würden über einen gewissen Zeitraum den ganzen vorhandenen Farbstoff spalten. Deshalb muss die Reaktion nach einiger Zeit durch die Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt werden. Die enzymatische Umsetzung des Farbsubstrates erfolgt quantitativ und kann photometrisch über die Änderung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm bestimmt werden. Ein quantitativer Nachweis des Antigens in der Probe kann durch Abgleich mit einer Standardreihe erbracht werden.

Durchführung:

Der Nachweis von TNF- α , Interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-5, IL-10 und unspezifischem IgE erfolgte unter Verwendung der entsprechenden ELISA Kits von R&D oder BD Biosciences. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Der Primärantikörper wurde entsprechend der Anweisung des Kits in Carbonatpuffer verdünnt und je 100 μl in eine Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Hiernach wurde über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Waschgängen im Waschautomaten mit 0,05%igem Tween in PBS unterzogen und durch Ausschlagen auf einem Papiertuch getrocknet.

300 µl Block Puffer wurden in jede Vertiefung pipettiert, um unspezifische Bindungen abzublocken und es wurde eine Stunde inkubiert. Es folgte erneutes Waschen. Jeweils 100 µl der zu untersuchenden Probe wurden in Doppelbestimmungen in die Vertiefungen pipettiert. Zeitgleich wurde eine Verdünnungsreihe des Antigenstandards auf die Platte aufgebracht. Anschließend wurde für 2 Stunden in der feuchten Kammer inkubiert.

Die Probe beziehungsweise der Standard wurden durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und anschließendes Ausschlagen auf einem Papierhandtuch aus den Vertiefungen entfernt, so dass nur spezifisch an den Primärantikörper gebundenes Antigen zurückblieb. Der Detektionsantikörper wurde entsprechend der Anweisung des jeweiligen Kits verdünnt und 100 µl in jede Vertiefung gegeben. Es wurde 2 Stunden inkubiert. Es folgte erneutes sechsmaliges Waschen mit PBS/Tween. Die Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) wurde ebenfalls entsprechend der Anweisung verdünnt. 100 µl HRP-Lösung wurden in die Vertiefungen gebracht und 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde TMB in die Vertiefungen pipettiert. Die Farbreaktion fand im Dunkeln statt, nach ca. 15 min wurde sie durch Zugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ abgestoppt und die ODs bei 450 nm sofort im ELISA-Reader photometrisch vermessen. Die Bestimmung der Konzentrationen fand anhand der Standardkurven unter Verwendung des Programms Mikrowin statt.

Das ELISA Kit für die Quantifizierung OVA spezifischen IgE erfolgte nach einem leicht abgewandelten Protokoll. Die Platte war bereits bei Lieferung mit dem Primärantikörper versehen und das Protokoll begann mit dem Auftragen des Probenmaterials und der Standards. Abgesehen davon entsprachen Durchführung und Wirkprinzip den zuvor beschriebenen ELISA Kits.

Der Immunassay zur Bestimmung Maxadilan und M65 spezifischer Antikörper entsprechend der Protokolle für die ELISA Kits von R&D Systems konzipiert und durchgeführt. Die Platten wurden anstelle des Primärantikörpers mit 1 µg/ml Maxadilan bzw. M65 in Carbonatpuffer beschickt. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % BSA in PBS auf die Platten gegeben. Als Detektionsantikörper wurde ein HRP assoziierte Ziege anti Maus IgG Antikörper verwendet, nach dessen Zugabe die Farbreaktion sofort einsetzte. Die Reaktion wurde nach 15 min mit 2 N H₂SO₄ gestoppt. Es erfolgte eine relative Auswertung anhand der OD.

2.22 Azan-Novum-Färbung nach Geidies

Für die Anfertigung histologischer Färbungen wurden von den OCT-befüllten Lungen am Kryostat 14 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Die Lagerung der bei Raumtemperatur getrockneten Schnitte erfolgte bei -20 °C.

Die Azan-novum-Färbung nach Geidies soll kollagenes Bindegewebe und Schleim blau, Zellkerne und Muskulatur rot und Zellgranula rot bis gelb färben. Die Präparate wurden zunächst 30 min in Kernechtrotlösung gebracht. Die Objektträger wurden anschließend in zwei Wasserbädern mit Aqua bidest. gewaschen und zum Beizen für 10 min in 5 %ige wässrige Phosphorwolframsäure überführt. Es wurde erneut in zwei Wasserbädern mit Aqua bidest. gewaschen. Die Objektträger wurden für 2 min in eine Anilinblau-Orange G-Lösung gebracht und danach in zwei Wasserbädern mit Aqua bidest. gewaschen. Entwässert und differenziert wurde in Isopropanol bis die Gewebebestandteile scharf hervortraten. Dazu wurden die Präparate von Zeit zu Zeit einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen. Die Schnitte wurden dreimal für je 1 min in Xylol entwässert und anschließend in Entellan eingedeckelt.

2.23 Masson-Goldner-Färbung

Bei der Masson Goldner Färbung werden Bindegewebe und Schleim blau, Erythrozyten leuchtend rot, Muskelgewebe rot, Zytoplasma orange bis rot und die Zellkerne braunschwarz angefärbt. Masson Goldner Färbungen wurden aus den PFA fixierten Lungenpräparaten angefertigt. Dazu wurden die Lungenflügel in Paraffin eingebettet und es wurden 3 µm dicke Schnitte für die Färbung angefertigt. Die Präparate wurden zunächst über drei 5 minütige Xylol-Bäder entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate über 4 Schritte von jeweils 3 min durch eine absteigende Ethanolreihe rehydriert. Es folgte eine 3 minütige Inkubation in Aqua bidest..

Zur Färbung wurden die Präparate 8 min in Weigerts Eisenhämatoxilinlösung gebracht. Es folgten zwei Waschschrte für 5 min in Aqua bidest. Die Präparate wurden nun für 10 min in Ponceau-Säurefuchsin gebracht. Es wurde für 10 s in Aqua bidest. gewaschen. Es folgten 10 s in 1 %iger Essigsäure, gefolgt von 8 min Molybdato-phosphorsäure-Orange G. Nach zwei Schritten 1 %iger Essigsäure, einmal für 1 min, einmal für 10 s wurden die Präparate für 14 min in Lichtgrünlösung gebracht. Die Proben wurden nun einmal in 1%ige Essigsäure und

anschließend in Aqua bidest. getaucht.

Es folgte eine Entwässerung über drei Ethanol und drei Xylol Stufen bevor die Präparate mit Eukitt eingedeckelt wurden.

2.24 Fluoreszenzfärbungen

Zur Darstellung von eosinophilen Granulozyten im Lungengewebe wurde eine Fluoreszenzfärbung mit einem Ratten Antikörper gegen murines MBP durchgeführt, welches in den Granula der eosinophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt.

Am Kryostat wurden 5 μm dicke Schnitte der OCT befüllten Lungen so angefertigt, dass ein Hauptbronchus in der Schnittebene zu sehen war. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur getrocknet und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Färbung wurden die Schnitte aufgetaut und in PBS rehydriert. Die Schnitte wurden in Shandon Cover Plates eingespannt und mit zwei mal 2 ml PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit 200 μl einer 4 %igen *Goat*-Serum Lösung 15 min geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper 1:5000 in PBS auf 0,2 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und für 60 min auf die Präparate gegeben. Es wurde dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. Es wurden 200 μl einer 4 %igen *Donkey*-Serum Verdünnung zum Blocken auf die Präparate gebracht. Nach einer 15 min Inkubation wurde mit 200 μl des vom Esel stammenden Alexa 594 markierten Anti Ratten IgG Sekundärantikörper 1:600 verdünnt für 60 min gefärbt. Es wurde erneut dreimal mit 2 ml PBS gewaschen. Die Objektträger wurden aus den Shandon Cover Plates entnommen und anschließend mit Vectashield eingedeckelt. Die Präparate wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und auf Akkumulationen von eosinophilen Granulozyten untersucht.

2.25 Mikroskopische Zelldifferenzierung nach Pappenheim

Prinzip:

Bestimmte Zellkompartimente unterscheiden sich durch ihren Gehalt an sauren oder basischen Molekülen. Saure Bestandteile der Zelle mit negativer elektrischer Ladung, wie die DNA in den Nuclei oder die RNA der Nucleoli und des Zytoplasmas sind basophil und lassen

sich mit basophilen Farbstoffen wie Giemsa in wässriger Lösung bläulich färben. Viele zytoplasmatische Proteine sind dagegen azidophil und färben sich mit sauren Farbstoffen wie May-Grünwald rot. Zytoplasma und Zellkerne sowie charakteristische Granula der Zellen sind auf diese Weise mikroskopisch erkennbar und erlauben eine morphologische Differenzierung.

Durchführung:

$1 \cdot 10^5$ Zellen aus der BALF werden in 250 l PBS durch Zentrifugation in einer Zytocentrifuge durch Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm auf einen Objektträger gebracht und luftgetrocknet. Die getrockneten Zytospots wurden 5 min lang in May-Grünwald-Lösung gefärbt und anschließend 2 min in PBS gespült. Danach wurde für 20 min mit Giemsa-Lösung 1:20 gefärbt und anschließend mit Aqua bidest. gewaschen.

2.26 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism, Version 4.03 durchgeführt. Für die Darstellung der Ergebnisse in Graphen und Tabellen wurde für jede Gruppe der Mittelwert und der *standard error of the mean* (SEM) berechnet. Alle Ergebnisse wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Bei einer Wahrscheinlichkeit gegen eine Normalverteilung von $\alpha \leq 0,05$ wurde von einer Normalverteilung ausgegangen. Lag eine Normalverteilung vor wurde für die Signifikanzprüfung von Unterschieden zwischen 2 Gruppen der ungepaarte *two-tailed Students T-test* verwendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen mit einer Kontrollgruppe wurde bei Normalverteilung die *one-way analysis of variance* mit dem Dunnett *post test* verwendet. Lag keine Normalverteilung vor wurde für die Berechnung von signifikanten Unterschieden der non-parametrische *Mann-Whitney-U-Test* verwendet. Bei allen verwendeten Tests wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant befunden.

3 Ergebnisse

3.1 VIP/PACAP Rezeptor Expression

Mittels *Real Time* PCR wurde die Expression der VIP/PACAP Rezeptoren in homogenisiertem Lungengewebe untersucht. Dabei wurden die Expressionen unter physiologischen Bedingungen und unter inflammatorischen Bedingungen nach Anwendung des akuten Asthmodells miteinander verglichen. Die Expression der Rezeptoren wurde auf das *House Keeping Gene* PBGD normalisiert. Bei dem Verfahren kam es generell zu hohen Standardabweichungen, die 34 % bis 84 % des Mittelwerts entsprachen. Die Expression von VPAC1 betrug normalisiert auf PBGD zwischen dem 1,02 und 1,49 fachen der Expression von PBGD (Abb. 7A). Angesichts der hohen Standardabweichungen sind zwischen den Gruppen keine Unterschiede festzustellen.

Die Expression von VPAC2 ist in der Positivkontrollgruppe mit einem Mittelwert von 8,26 mehr als doppelt so hoch wie in der Negativkontrollgruppe mit 3,88 (Abb. 7B). Ähnliches gilt für die Expression von PAC1 welches in der Positivkontrollgruppe mit 4,66 ebenfalls mehr als doppelt so hoch exprimiert wird, wie die Negativkontrollgruppe mit 1,91 (Abb. 7C).

Für VPAC2 und PAC1 wurde eine signifikant verstärkte Expression unter entzündlichen Bedingungen im Lungengewebe detektiert.

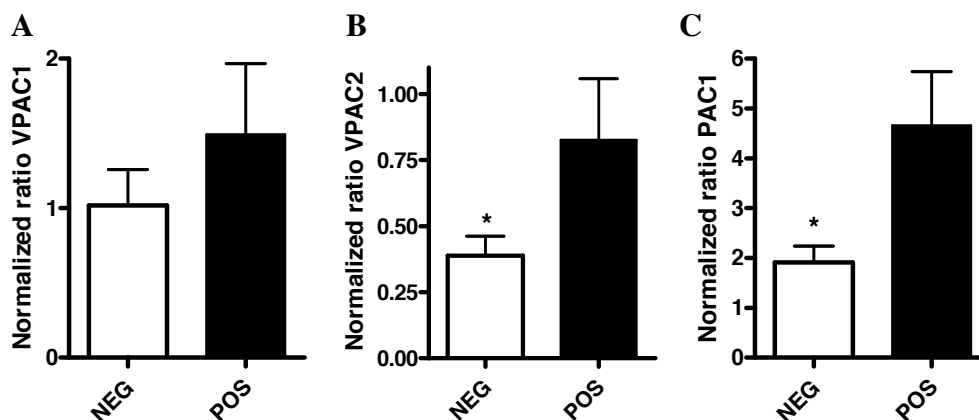


Abb. 7: Expression der VIP/PACAP Rezeptoren normalisiert auf PBGD; VPAC1 (A); VPAC2 (B); PAC1 (C), Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem two-tailed students T-test bestimmt; *= $p \leq 0,05$.

Um zu untersuchen auf welchen Zellen der PAC1 Rezeptor in der Lunge exprimiert wird, wurden verschiedene Zellpopulationen des Immunsystems aus naiven Mäusen isoliert und qualitativ auf die PAC1 Expression untersucht. T-Zellen, Makrophagen und DC wurden anhand von Hinweisen aus der Literatur als die wahrscheinlichsten Kandidaten PAC1 positiver Immunzellen befunden (86, 87, 104). Für die Untersuchungen wurde in einzelnen PCR Ansätzen die aus den verschiedenen Zelltypen generierte cDNA zur Amplifikation von PAC1 Fragmenten verwendet. In jedem Ansatz wurde, als Nachweis für die Funktionalität der PCR, eine PBGD Kontrolle mitgeführt. Die zu erwartenden Fragmentgrößen betragen 181 bp für PBGD und 183 bp für PAC1. Die DNA Proben wurden in je zwei Ansätzen aus unterschiedlichen Tieren aufgetragen. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen wurde ein dritter Ansatz, dessen Transkriptionsansatz ohne das Enzym reverse Transkriptase durchgeführt wurde, als RNA Kontrolle mitgeführt.

Die Expression von PAC1 konnte in isolierten DC auf RNA Ebene durch PCR nachgewiesen werden. Bei den DNA Proben der DC sind unterhalb der 200 bp Bande des 100 bp DNA Markers sowohl bei den PBGD Ansätzen (Taschen 1,2), als auch bei den PAC1 Ansätzen (Taschen 4,5) deutliche Banden zu sehen (Abb. 8A). Bei den Ansätzen mit T-Zell cDNA (Abb. 8B) und Makrophagen cDNA (Abb. 8C) sind jeweils nur die PBGD Banden zu sehen. Eine Expression von PAC1 konnte in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden.

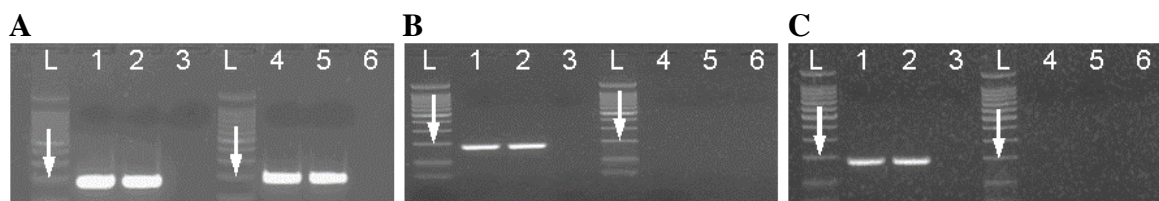


Abb. 8: Gelbilder der PBGD und PAC1 PCR Ansätze für DC (A), T-Zellen (B) und Makrophagen (C); L= 100 bp DNA Ladder; Tasche 1 und 2: cDNA Ansätze für PBGD; Taschen 3: RNA Ansätze für PBGD; Taschen 4 und 5: cDNA Ansätze für PAC1; Taschen 6: RNA Ansätze für PAC1; Die erwarteten Produktgrößen lagen bei 183 bp für PAC1 und 181 bp für PBGD.

3.2 PAC1 im akuten Modell

In der ersten Maxadilan-Studie wurde ein akutes Asthmamodell verwendet, in dem der spezifische PAC1 Agonist Maxadilan auf seine Wirkung im Asthmamodell untersucht wurde. Die Tiere wurden zu n=15 in eine nicht-sensibilisierte Negativkontrollgruppe, eine sensibilisierte Positivkontrollgruppe und eine sensibilisierte und Maxadilan behandelte Behandlungsgruppe eingeteilt.

Es wurden insbesondere entzündliche Prozesse durch die Erfassung der IgE Konzentration im Blut Plasma, durch histologische Färbungen von Lungenschnitten, eine Zelldifferenzierung der BALF Zellen und durch die Quantifizierung von Zytokinen in der BALF untersucht. Weiterhin wurden die AHR und die NHR, sowie die Expression der VIP/PACAP Rezeptoren im Lungengewebe quantitativ erfasst.

3.2.1 Entzündung

Um die Sensibilisierung der Positivkontrollgruppe und der Maxadilan behandelten Gruppe darzustellen, wurden die Plasma IgE-Konzentrationen geprüft (Abb. 9). Während bei der Negativkontrollgruppe im Vergleich zur Positivkontrollgruppe nur sehr geringe IgE Werte um 100 pg/ml detektiert wurden, wurden bei der Maxadilan behandelten Gruppe ähnlich wie bei der Positivkontrollgruppe Werte zwischen 3000 pg/ml 7500 pg/ml gemessen. Die Negativkontrollgruppe war gegenüber der Positivkontrollgruppe signifikant reduziert, während sich zwischen der Positivkontrollgruppe und der Maxadilan behandelten Gruppe keine statistischen Unterschiede finden ließen.

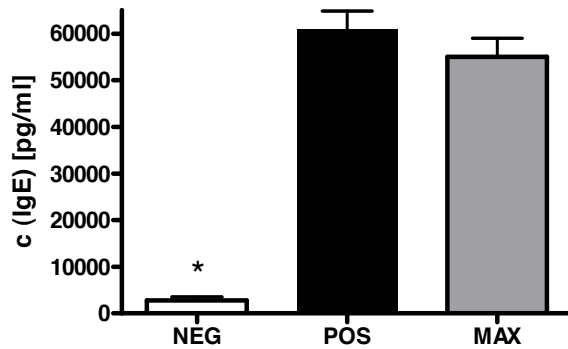


Abb. 9: Plasma IgE Konzentrationen; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

Die Zellzahlen der in der BALF detektierten Immunzellen zeigten bei den drei Gruppen unterschiedliche Verteilungsmuster (Abb. 10). Die Gesamtzellzahlen bei der Negativkontrollgruppe waren mit $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/ml im Mittelwert gegenüber der Positivkontrollgruppe mit $0,75 \cdot 10^6$ Zellen/ml deutlich reduziert, während bei der Maxadilan behandelten Gruppe kein Unterschied zur Positivkontrollgruppe festzustellen war.

Bei der Negativkontrollgruppe wurden mit einem durchschnittlichen Anteil von über 95 % fast ausschließlich Makrophagen gefunden. Eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Lymphozyten waren nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Die Positivkontrollgruppe wies vor allem bei den eosinophilen Granulozyten mit $0,285 \cdot 10^6$ und über 40 % der Gesamtzellzahl einen starken, signifikant erhöhten Gehalt gegenüber der Negativkontrollgruppe auf. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten waren gegenüber der Negativkontrollgruppe um mindestens das Dreifache signifikant erhöht. Maxadilan behandelte Tiere hatten der Positivkontrollgruppe gegenüber einen signifikant reduzierten Gehalt eosinophiler Granulozyten in der BALF. Weiterhin war bei den Maxadilan behandelten Tieren im Vergleich zur Positivkontrollgruppe eine leichte, aber dennoch signifikante Erhöhung der neutrophilen Granulozyten festzustellen.

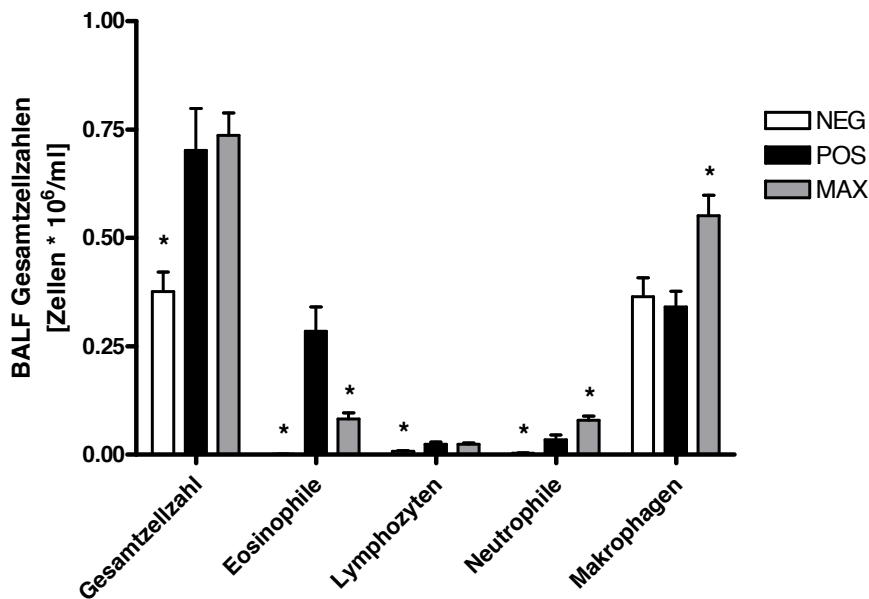


Abb. 10: Zellzahlen der BALF; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

Zur histologischen Untersuchung wurden Azan Färbungen von Lungenschnitten angefertigt (Abb. 11). Auf den Bildern waren sowohl Blutgefäße als auch Atemwege sichtbar, die von einem Netzwerk von Bindegewebsfasern umgeben waren. Bei der Atemwegswand konnte die Epithelschicht mit Mukus, die Basalmembran und die Muskelschicht differenziert werden. Die Blutgefäße waren durch eine dünnere Gefäßwand, bestehend auch Epithel, Lamina propria und glatter Muskulatur charakterisiert.

In der Positivkontrollgruppe waren Akkumulationen von Zellen um die Atemwege und Blutgefäße sichtbar, die in der Negativkontrollgruppe nicht zu sehen waren. Präparate der Maxadilan behandelten Gruppe wiesen ebenfalls leichte Zellakkumulationen auf.

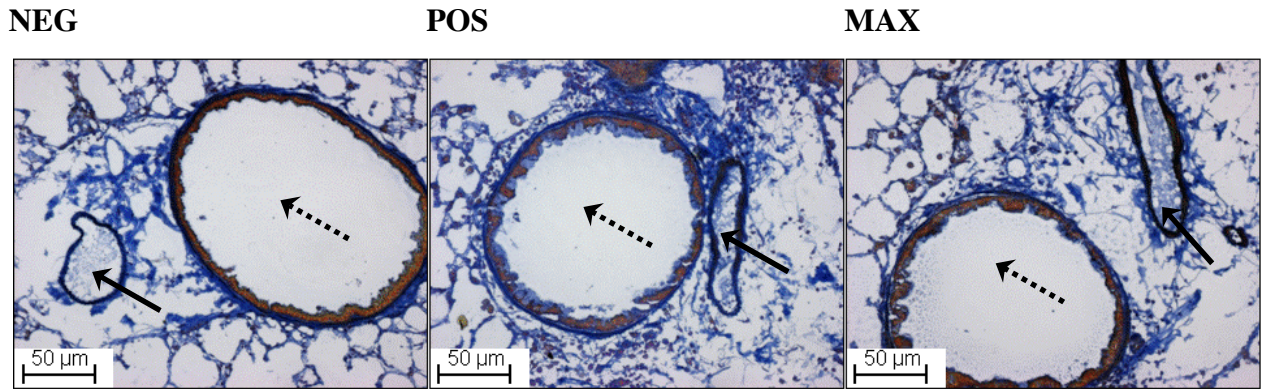


Abb. 11: Repräsentative Bilder von Azan gefärbten Lungengewebschnitten; $\cdots\rightarrow$ = Atemweg, \rightarrow = Blutgefäß; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe.

Als Th2 Zytokin wurde IL-5 (Abb. 12A) und als proinflammatorisches Zytokin TNF- α (Abb. 12B) in der BALF quantifiziert. Die IL-5 Konzentrationen der Negativkontrollgruppe waren im Mittel mit 49 pg/ml ungefähr halb so groß wie die der Positivkontrollgruppe mit 103 pg/ml. Der Mittelwert der Maxadilan behandelten Gruppe war signifikant niedriger als die Positivkontrollgruppe.

Bei TNF- α war der Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrollgruppe noch deutlicher. Mit 431 pg/ml war die TNF- α Konzentration der Positivkontrollgruppe durchschnittlich fast dreimal höher als die der Negativkontrollgruppe. Die Maxadilan behandelte Gruppe lag auf vergleichbarem Niveau mit der Positivkontrollgruppe und unterschied sich von dieser nicht signifikant.

Die Negativkontrollgruppe wies für beide Zytokine deutlich geringere Konzentration auf, als die Positivkontrollgruppe. Im Falle von IL-5 zeigte die Behandlung mit Maxadilan eine Reduktion des Zytokins in der BALF. Bei TNF- α war kein Effekt durch Maxadilan zu erkennen.

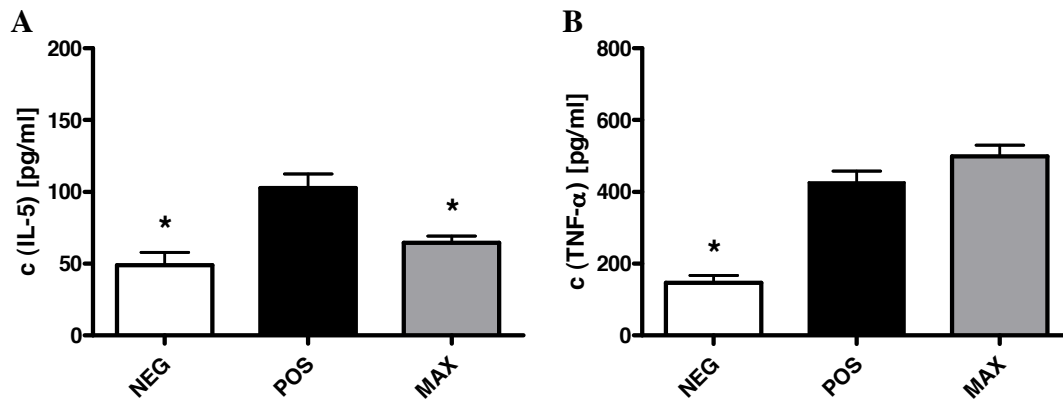


Abb. 12: BALF Zytokine: IL-5 (A) TNF- α (B); Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

3.2.2 Lungenfunktion

Es wurde 24 Stunden nach der letzten Allergenprovokation eine Messung der Lungenfunktion unter aerosolischer Capsaicinprovokation durchgeführt um die NHR zu erfassen. Durch die Verwendung von Capsaicin, welches sensible Nervenfasern in der Lunge reizt sollte eine Beteiligung von PAC1 an der NHR untersucht werden. Als Parameter für die NHR wurde die TB erfasst (Abb. 13A). Es war zu erkennen, dass die Negativkontrollgruppe kürzere TB bei gleicher Capsaicinkonzentration aufwies, als die Positivkontrollgruppe. Diese Abweichung war bei einer Capsaicinkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ am deutlichsten. Die Maxadilan behandelten Tiere zeigten eine ähnliche Reaktion auf das aerosolisierte Capsaicin wie die Positivkontrollgruppe. Statistisch ließ sich bei keiner Konzentration ein signifikanter Unterschied zur Positivkontrollgruppe nachweisen.

Bei der weitere 24 Stunden später durchgeführten Messung der AHR unter aerosolischer MCh-Provokation wurde die ED50 für die einzelnen Gruppen bestimmt (Abb. 13B); also die MCh-Konzentration, die zu einem Abfall des Atemflusses um 50 % führt. Eine hohe ED 50 spricht demzufolge für eine hohe Toleranz gegenüber dem Stimulus MCh und eine geringe AHR.

Zwischen den drei Gruppen konnten bei der AHR Messung keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Mittelwert gab es zwar Unterschiede von über 10 mg, aber aufgrund der vergleichsweise hohen Standardabweichungen (Negativkontrollgruppe 22,7;

Positivkontrollgruppe 18,4; Maxadilan behandelte Gruppe 14,3) waren keine statistischen Unterschiede zu ermitteln.

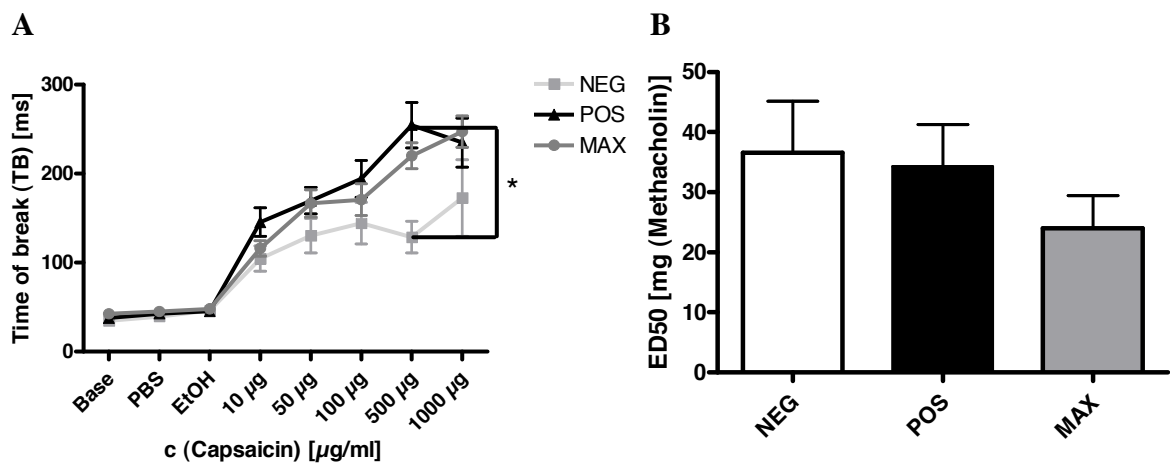


Abb. 13: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen; Time of breaking unter Capsaicin Provokation, aufgetragen gegen die Capsaicin Konzentrationen (A); Effective Dose 50 MCh (B); Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; * = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

3.3 PAC1 im chronischen Modell

In der zweiten Maxadilan-Studie wurde ein chronisches Modell verwendet, wobei Tiere jeder Gruppe zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Studie analysiert wurden: Einem akuten Zeitpunkt nach 2 Allergenprovokationen, einem subchronischen Zeitpunkt nach 8 Allergenprovokationen und einem chronischen Zeitpunkt nach 28 Provokationen. Neben dem PAC1 Agonisten Maxadilan wurde in dieser Studie der PAC1 Antagonist M65 getestet. Es wurden 7 Gruppen mit je 16 Tieren für jeden der drei Aufarbeitungszeitpunkte eingeteilt. Eine nicht sensibilisierte Negativkontrollgruppe, eine sensibilisierte Positivkontrollgruppe, eine sensibilisierte Dexamethason behandelte Behandlungskontrolle und sowohl für Maxadilan, als auch für M65 je eine sensibilisierte und eine nicht sensibilisierte Behandlungsgruppe.

Es wurden für alle Gruppen zu allen Zeitpunkten die in der BALF enthaltenen Zellen und Zytokine quantitativ erfasst und es wurden Maxadilan und M65 spezifische Antikörper im Plasma bestimmt. Weiterhin wurden Masson Goldner Färbungen aus Paraffin fixiertem Lungengewebe hergestellt.

Für die Tiere des akuten Zeitpunkts wurden zusätzlich unspezifische und OVA spezifische IgE Konzentrationen im Plasma gemessen und Fluoreszenzfärbungen für eosinophile Granulozyten angefertigt.

Zum akuten Zeitpunkt gab es nur geringe Abweichungen der nicht sensibilisierten Maxadilan und M65 behandelten Gruppen im Vergleich zur Negativkontrollgruppe. Daher sind diese Gruppen für diesen Aufarbeitungzeitpunkt der Übersicht halber nicht dargestellt. Entsprechend ist im Folgenden mit der Maxadilan behandelten Gruppe die sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe und mit der M65 behandelten Gruppe entsprechend die sensibilisierte M65 behandelte Gruppe gemeint.

3.3.1 Akute Phase Entzündung

Um eine Sensibilisierung der Positivkontrollgruppe, der Dexamethason behandelten Gruppe und der Maxadilan und der M65 behandelten Gruppe darzustellen wurden die Plasma IgE Spiegel quantifiziert. Es wurde sowohl das gesamte IgE als auch das OVA spezifische IgE gemessen. Im Blutplasma der Negativkontrollgruppe ließen sich nur geringe Mengen unspezifischen IgE finden (Abb. 14A). Die Positivkontrollgruppe wies mit einem Mittelwert von 11205 pg/ml eine fünfzehnfach höhere IgE Konzentration auf. Die Konzentrationen der Maxadilan behandelten Gruppe, der M65 behandelten Gruppe und der Dexamethason behandelten Gruppe lagen sehr dicht beieinander und unterschieden sich nicht signifikant von der Positivkontrollgruppe.

Für die Negativkontrollgruppe konnte praktisch kein OVA spezifisches IgE nachgewiesen werden (Abb. 14B). Die Messungen ergaben als Mittelwert 42 pg/ml. Mit 4804 pg/ml bei der Positivkontrollgruppe konnte eine gegenüber der Negativkontrollgruppe stark erhöhte Konzentration OVA spezifischen IgE festgestellt werden. Die Dexamethason, die Maxadilan, und die M65 behandelte Gruppe wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Positivkontrollgruppe auf.

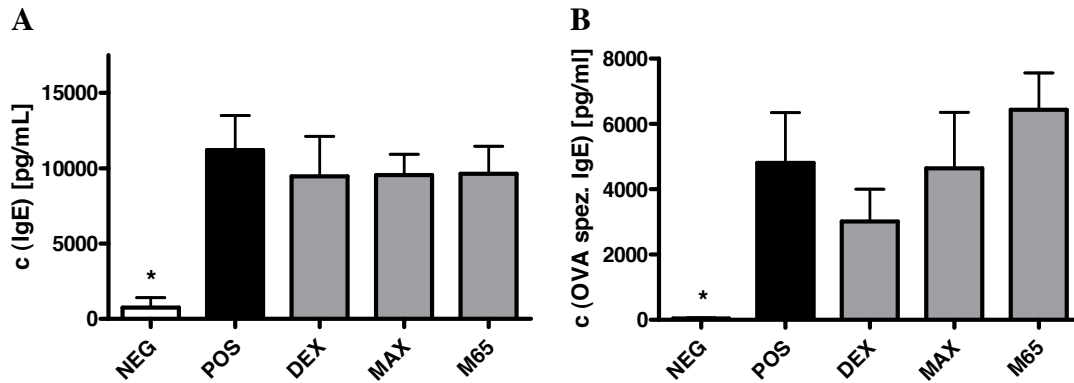
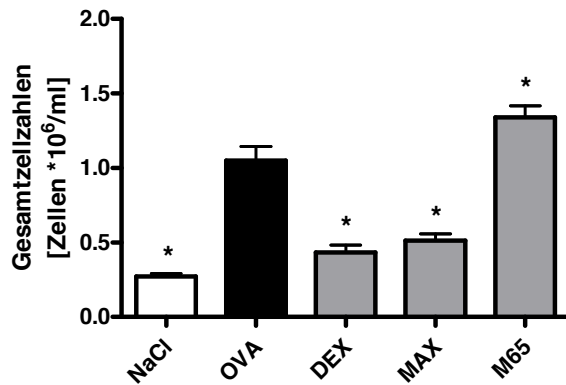


Abb. 14: Plasma IgE Konzentrationen; unspezifisches IgE (A) und OVA spezifisches IgE (B); Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, M65= M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

In der BALF der Negativkontrollgruppe wurden durchschnittlich $0,27 \cdot 10^6$ Zellen/ml gemessen (Abb.15). Mit einem Mittelwert von $1,04 \cdot 10^6$ Zellen/ml waren die Zellzahlen in der BALF der Positivkontrollgruppe mehr als dreieinhalb fach erhöht. Die Dexamethasonbehandlung führte zu einer Verringerung der Zellzahlen. Die Maxadilan behandelte Gruppe wies nur halb so große Zellzahlen auf wie die Positivkontrollgruppe und war mit den verwendeten statistischen Mitteln nicht von der Dexamethason behandelten Gruppe zu unterscheiden. Die M65 behandelte Gruppe war gegenüber der Positivkontrollgruppe signifikant erhöht.



*Abb. 15: Gesamtzellzahlen der BALF zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, M65= M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.*

Bei der Zelldifferenzierung der BALF Zellen wurde in Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten unterschieden. In der BALF der Negativkontrollgruppe wurden mit $0,24 \cdot 10^6$ Zellen/ml zu 88 % Makrophagen gefunden (Abb. 16A). Mit 11 % waren die neutrophilen Granulozyten die zweitgrößte Population (Abb. 16B), während eosinophile Granulozyten (Abb. 16C) und Lymphozyten (Abb. 16D) zusammen 1 % der Gesamtzellen ausmachten. Die Positivkontrollgruppe wies mit $0,53 \cdot 10^6$ Zellen/ml einen deutlich höheren Anteil eosinophiler Granulozyten auf. Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten waren gegenüber der Negativkontrollgruppe ebenfalls erhöht.

Die Dexamethasonbehandlung führte zu einer Reduktion der eosinophilen Granulozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Lymphozyten.

Die Maxadilanbehandlung zeigte im Bezug auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten keine Wirkung gegenüber der Positivkontrollgruppe. Die eosinophilen Granulozyten betragen jedoch mit $0,01 \cdot 10^6$ Zellen/ml nur ca. ein Fünftel der Positivkontrollgruppe und lagen mit der Dexamethason behandelten Gruppe gleich auf. Die Zahl der Lymphozyten war ebenfalls signifikant reduziert.

Die M65 Behandlung führte im Vergleich zu Positivkontrollgruppe zu einer signifikanten Erhöhung der Makrophagen. Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie die Lymphozyten änderten sich nicht.

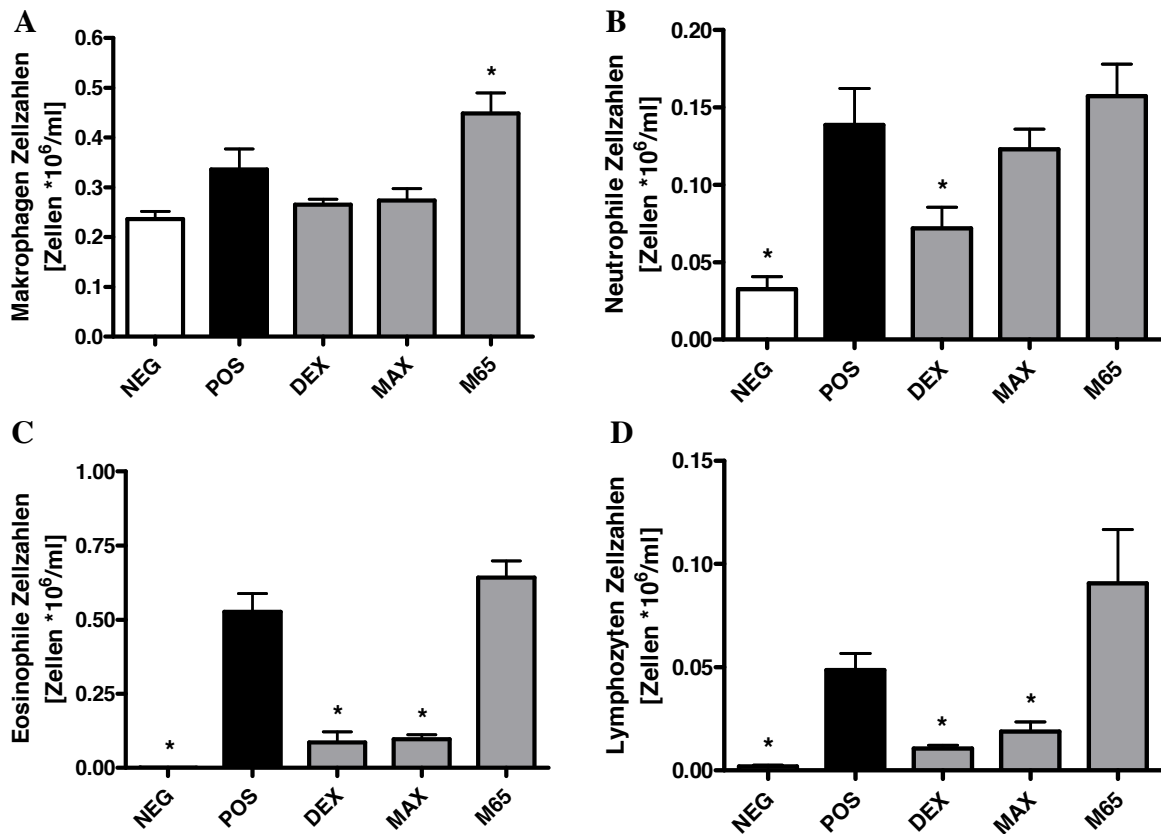
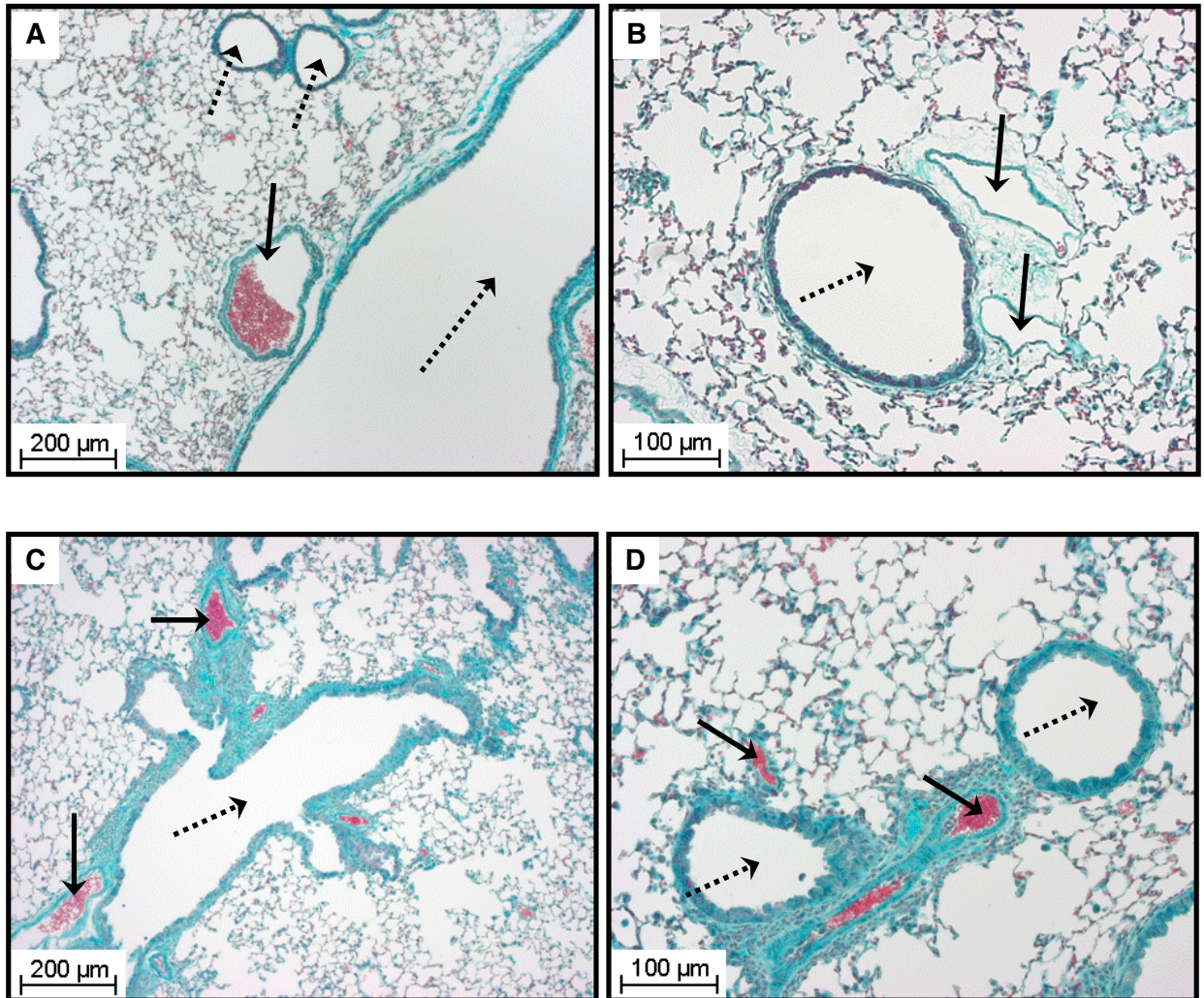


Abb16: Zellzahlen der BALF, Makrophagen (A), neutrophile Granulozyten (B), eosinophile Granulozyten (C), Lymphozyten (D); Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, M65= M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.

Masson-Goldner angefärbte Lungenschnitte zeigten bei der Negativkontrollgruppe die Struktur einer gesunden Lunge. Die Zellkerne waren dunkel, Zytoplasma orange/rot, Erythrozyten rot, Bindegewebe und Mukus grün, Muskelgewebe blass rot. Auf dem Übersichtsbild (Abb. 17A) und dem Detailbild eines peripheren Atemwegs (Abb. 17B) der Negativkontrollgruppe sind Atemwege mit vergleichsweise dünnen Wänden und Bindegewebe zu sehen, in dem nur wenige aufgrund hohen Plasmaanteils rotgefärbte Zellen zu erkennen sind. Die Atemwege werden typischer Weise von Blutgefäßen flankiert. In einigen sind rot gefärbte Erythrozyten zu erkennen. In der Positivkontrolle sind um Blutgefäße und Atemwege Akkumulationen rötlich gefärbte Zellen zu sehen (Abb. 17C). Auf dem Detailbild ist zu erkennen, dass die Atemwegswände verdickt sind und es ist eine Verdickung der Mukusschicht im Lumen zu erkennen (Abb. 17D). In den Lungen der

Dexamethason behandelten Gruppe waren nur geringe Zellakkumulationen sichtbar (Abb.17E, F). Bei der Maxadilan behandelten Gruppe waren ebenfalls leichte Zellakkumulationen und eine Verdickung der Mukusschicht zu erkennen (Abb. 17G, H). In den M65 behandelten Tieren waren wie auch in der Positivkontrollgruppe dichte Zellansammlungen um Blutgefäße und Atemwege (Abb. 17I) sowie eine verdickte Mukusschicht (Abb. 17J) in den Atemwegen zu sehen.



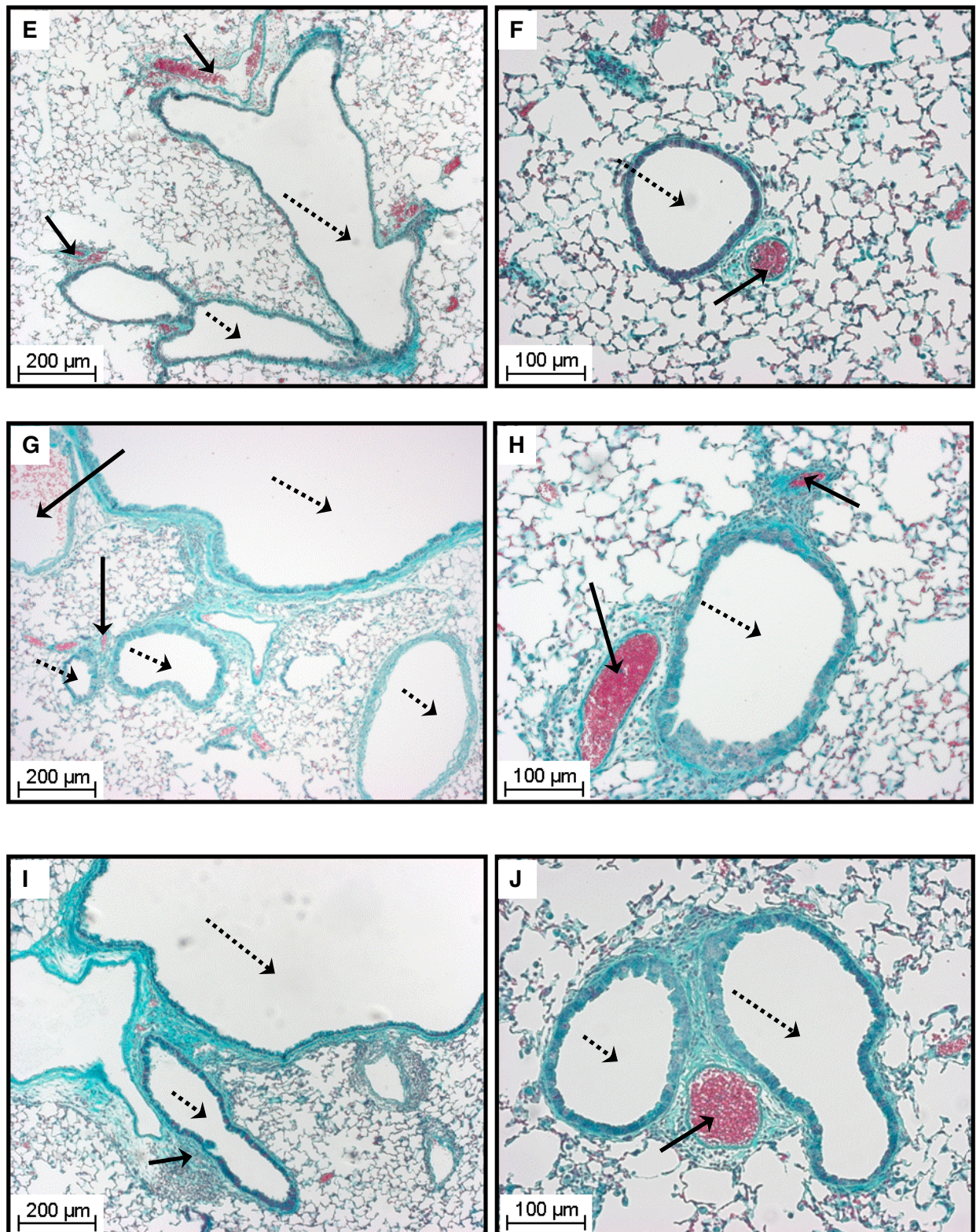
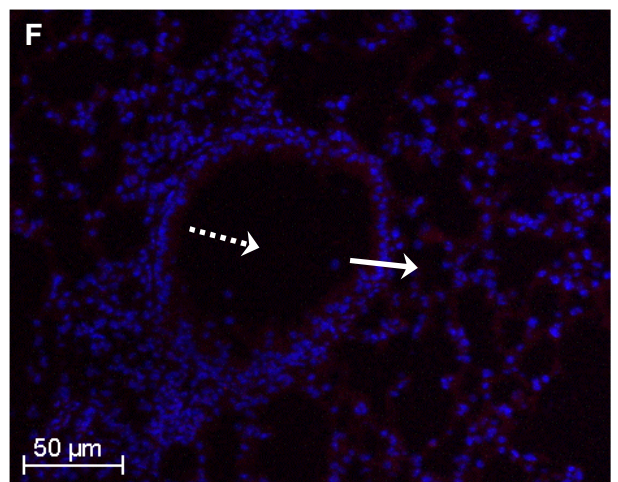
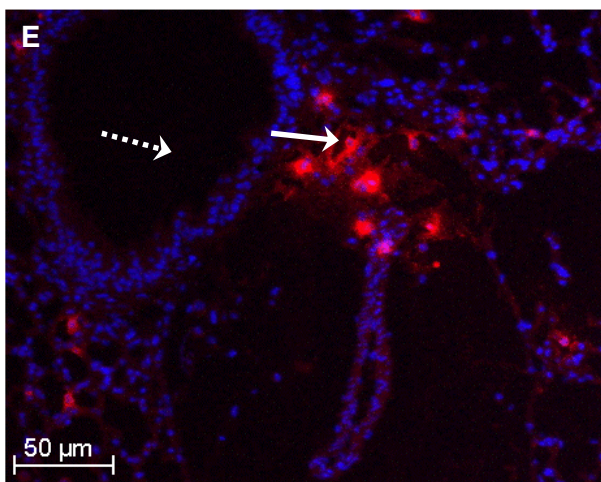
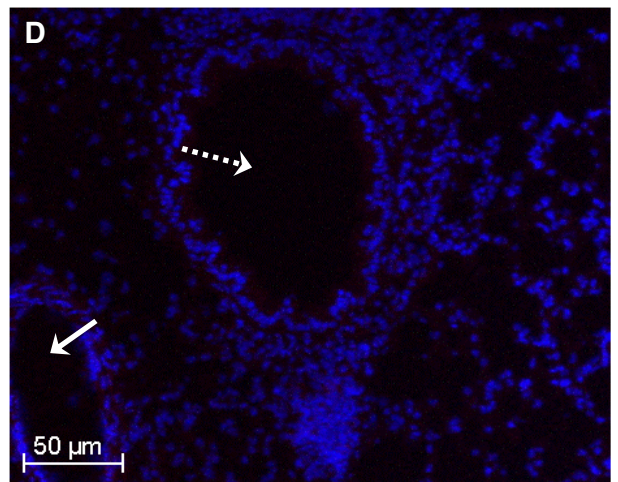
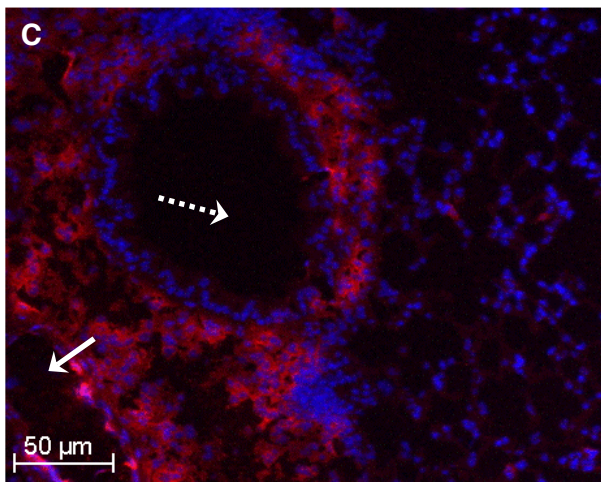
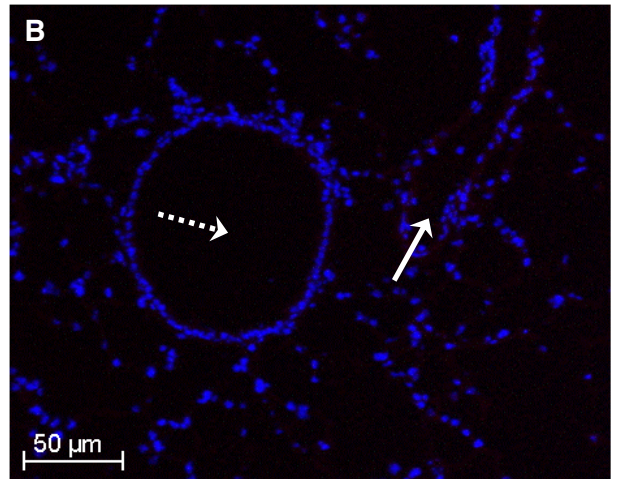
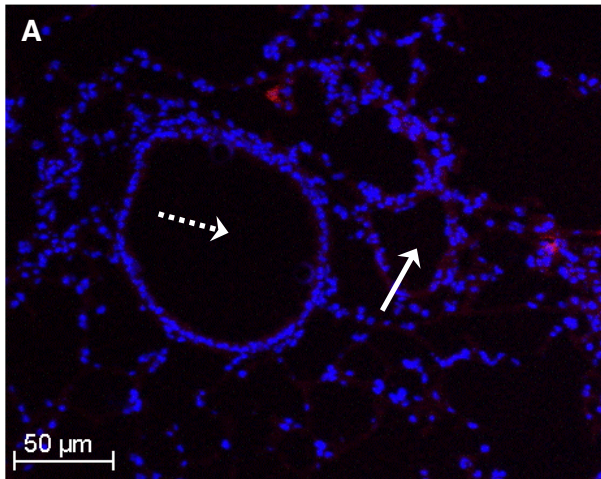


Abb. 17: Masson-Goldner Färbung Paraffin fixierter Lungenschnitte; Übersichtsbild und Detailbild der Negativkontrollgruppe (A und B), der Positivkontrollgruppe (C und D), der Dexamethason behandelten Gruppe (E und F), der Maxadilan behandelten Gruppe (G und H), der M65 behandelten Gruppe (I und J); $\cdots\rightarrow$ = Atemweg, \rightarrow = Blutgefäß.

Von OCT fixierten Lungenpräparaten wurden Fluoreszenzfärbungen angefertigt, in denen die Nuclei blau und das in den Granula der eosinophilen Granulozyten enthaltene MBP mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 549 rot angefärbt wurden. Für jede Gruppe sind zwei aufeinander folgende Schnitte eines Präparats für die Färbung verwendet worden. Auf dem ersten ist jeweils die Färbung der eosinophilen Granulozyten und die Kernfärbung zu sehen, während der zweite für die Isotypkontrolle der MBP Färbung verwendet wurde um die Spezifität der Färbung nachzuweisen. Auf keinem der Kontrollbilder waren rote Färbungen zu sehen, die auf unspezifische Bindungen hätten schließen lassen können (Abb. 18B, D, F, H, J). Auf jedem Bild ist sowohl ein peripherer Atemweg, als auch ein Blutgefäß zu dargestellt.

Für die Negativkontrollgruppe sind neben den Nuclei der Zellen des Lungengewebes nur vereinzelte eosinophile Granulozyten im Lungengewebe sichtbar (Abb. 18A). Das Bild der Positivkontrollgruppe zeigt rund um den zentral gelegenen Atemweg und das große unten links im Bild gelegene Blutgefäß eine starke MBP-Färbung (Abb. 18C). Einzelne eosinophile Granulozyten sind nicht zu differenzieren. Die Dexamethason behandelte Gruppe wies nur wenige vereinzelte eosinophile Granulozyten zwischen dem Atemweg und dem Blutgefäß auf dem Bild auf (Abb. 18E). Bei der Maxadilan behandelten Gruppe konnten vereinzelte eosinophile Granulozyten im Bereich der dargestellten Atemwege sichtbar gemacht werden (Abb. 18G). Größere Zellakkumulationen, in denen einzelne Zellen aufgrund der starken Färbung nicht differenzierbar waren wurden nicht gefunden. Die M65 behandelte Gruppe zeigte ebenfalls starke Färbungen im Bereich um den Atemweg im Zentrum des Bildes (Abb. 18I). Einzelne eosinophile Granulozyten sind auch hier nicht zu erkennen.



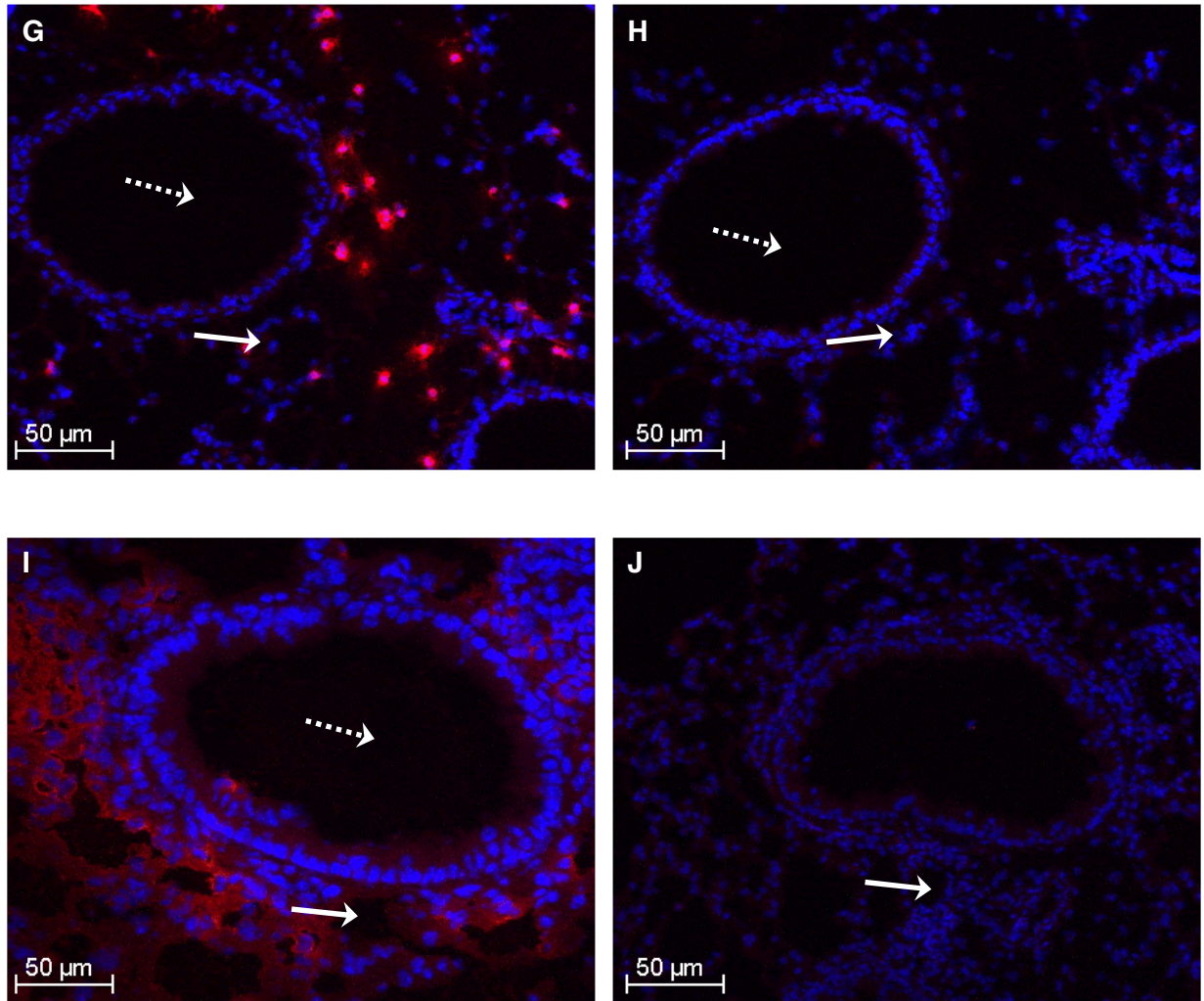


Abb. 18: Fluoreszenzfärbung von Lungenschnitten: Nuclei blau gefärbt, eosinophile Granulozyten rot gefärbt; links Fluoreszenzfärbung, rechts Isotypkontrollen der Negativkontrollgruppe (A und B), der Positivkontrollgruppe (C und D), der Dexamethason behandelten Gruppe (E und F), der Maxadilan behandelten Gruppe (G und H), der M65 behandelten Gruppe (I und J); $\cdots\rightarrow$ = Atemweg, \rightarrow = Blutgefäß.

Für die Erstellung des Zytokinprofils wurden IL-4, IL-5, IL-10 und Eotaxin-2 in der BALF quantifiziert. Der Gehalt an IL-4 in der BALF war in der Negativkontrollgruppe signifikant niedriger als in der Positivkontrollgruppe (Abb. 19A). Die Behandlung mit Maxadilan führte ebenso wie die mit M65 zu einer signifikanten Reduktion von IL-4 auf das Niveau der Negativkontrollgruppe. Die Dexamethason behandelte Gruppe war auf gleichem Niveau mit der Positivkontrollgruppe.

Die IL-5 Konzentration in der BALF der Negativkontrollgruppe war mit einem Mittelwert von 88 pg/ml halb so hoch wie in der Positivkontrollgruppe mit 176 pg/ml (Abb. 19B). Die

Dexamethason behandelte Gruppe wies keine nennenswerten Unterschiede zur Positivkontrollgruppe auf. Die Maxadilanbehandlung führte zu einer tendenziellen Reduktion der IL-5 Konzentration während durch M65 eine signifikante IL-5 Reduktion induziert wurde. Die gemessenen Eotaxin-2 Konzentrationen ergaben ein ähnliches Bild wie die Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten in der BALF (Abb. 19C). Der Eotaxin-2 Gehalt der Negativkontrollgruppe lag unter 50 % der Positivkontrollgruppe, welche einen Mittelwert von 498 pg/ml aufwies. Die Dexamethason Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion des Eotaxingehalts im Vergleich zur Positivkontrollgruppe auf 317 pg/ml. Die Maxadilan Behandlung führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion von Eotaxin-2 auf 290 pg/ml. Die M65 behandelte Gruppe wies keine statistisch verwertbaren Unterschiede im Vergleich zur Positivkontrollgruppe auf.

Die Konzentrationen von IL-10 der Negativkontrollgruppe, der Positivkontrollgruppe, der Maxadilan und der Dexamethason behandelten Gruppe wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 19D). Diese Gruppen lagen mit Mittelwerten zwischen 165 pg/ml und 200 pg/ml eng beieinander. Die M65 behandelte Gruppe war mit einem Mittelwert von 123 pg/ml jedoch gegenüber der Positivkontrollgruppe mit 189 pg/ml signifikant reduziert.

Die Maxadilan Behandlung führte zu einer deutlichen Reduktion des IL-4 und des Eotaxin-2 Gehalts in der BALF, während der IL-5 Gehalt nur tendenziell reduziert war. IL-10 wurde durch die Maxadilan Behandlung nicht beeinflusst. M65 induzierte eine Reduktion von IL-4, IL-5, Eotaxin-2 und IL-10.

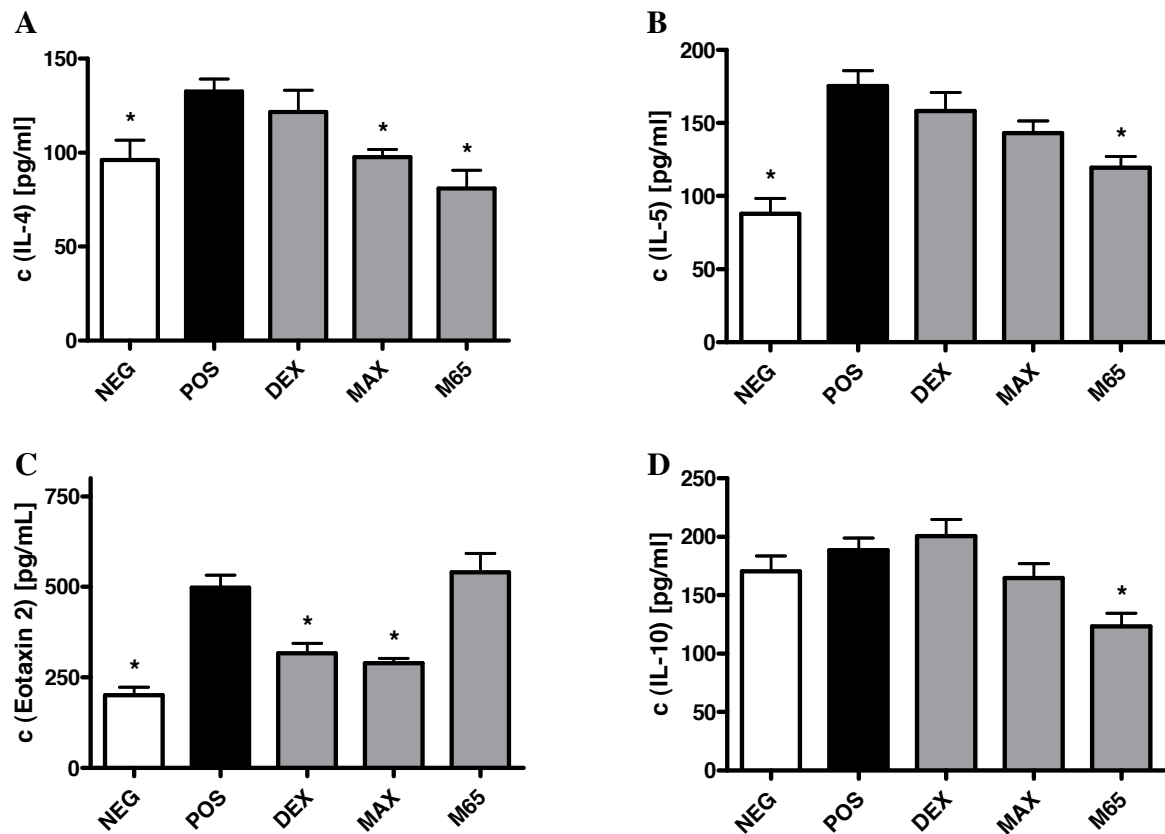
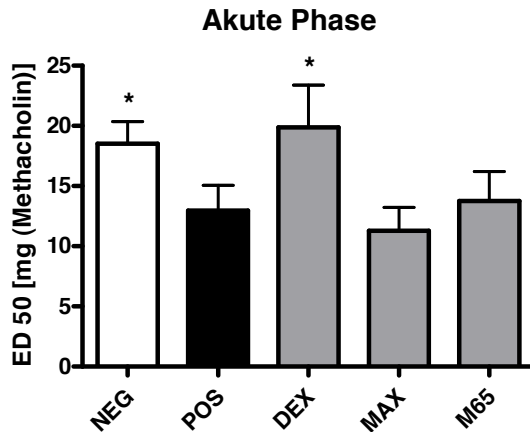


Abb. 19: BALF IL-4 (A), IL-5 (B), Eotaxin-2 (C) und IL-10 (D) Konzentrationen; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, M65= M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit der one-way analysis of variance mit dem Dunnett post test gegen die Positivkontrollgruppe bestimmt; * = $p \leq 0,05$.

3.3.2 Akute Phase Lungenfunktion

Zur Erfassung der AHR wurde wie in der akuten Maxadilan-Studie eine Lungenfunktionsmessung am *Head-Out-Body* Plethysmographen unter MCh-Provokation durchgeführt. Dabei wurde die ED50 berechnet (Abb. 20). Die berechnete Dosis, die bei der Negativkontrollgruppe zu einem Abfall des expiratorischen Flusses von 50 % führte, lag bei 20 mg und somit über der Positivkontrollgruppe mit 13 mg. Die Dexamethasonbehandlung führte zu einer Reduktion der MCh induzierten Irritation, während die Behandlung mit Maxadilan und die M65 keine Auswirkungen auf die Ergebnisse hatten.



*Abb. 20: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen; Effective Dose 50 (Metacholin); Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAX= Maxadilan behandelte Gruppe, M65= M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe.*

3.3.3 Entzündung Verlauf

Im Folgenden sind die Daten aller drei Aufarbeitungszeitpunkte dargestellt. Es wird in eine akute Phase (2 Allergenprovokationen), eine Subchronische Phase (8 Allergenprovokationen) und eine chronische Phase (28 Allergenprovokationen) unterschieden. Im Verlauf des Versuchs sind zwischen der Negativkontrollgruppe und den nicht sensibilisierten Maxadilan und M65 behandelten Gruppen teilweise erhebliche Unterschiede aufgetreten. Daher werden in den folgenden Graphen alle 7 Gruppen dargestellt. Die OVA sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe wird im Folgenden als MAXpos Gruppe bezeichnet, während die nicht sensibilisierte Maxadilan Gruppe als MAXneg Gruppe bezeichnet wird. Analog wird die sensibilisierte M65 behandelte Gruppe als M65pos Gruppe und die nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe als M65neg Gruppe bezeichnet.

Die Negativkontrollgruppe ebenso wie die Dexamethason behandelte Gruppe zeigte gegenüber der Positivkontrollgruppe über die gesamte Dauer des Versuchs niedrigere Gesamtzellzahlen, obwohl die Zellzahlen der Positivkontrollgruppe von der subchronischen zur chronischen Phase abnahmen (Abb. 21, 22A-C). Die Maxadilan Behandlung führte in der MAXpos Gruppe in der akuten und subchronischen Phase zu einer signifikanten Reduktion

der Gesamtzellzahlen im Vergleich zur Positivkontrollgruppe. Im Verlauf des Versuchs stiegen die Zellzahlen in der subchronischen Phase sowohl in der MAXpos Gruppe als auch in der MAXneg Gruppe stark an und waren in beiden Gruppen in der chronischen Phase gegenüber der Positivkontrollgruppe signifikant erhöht. Die M65pos Gruppe war zu allen drei Zeitpunkten gegenüber der Positivkontrollgruppe erhöht, während bei der M65neg Gruppe keine Effekte zu erkennen war.

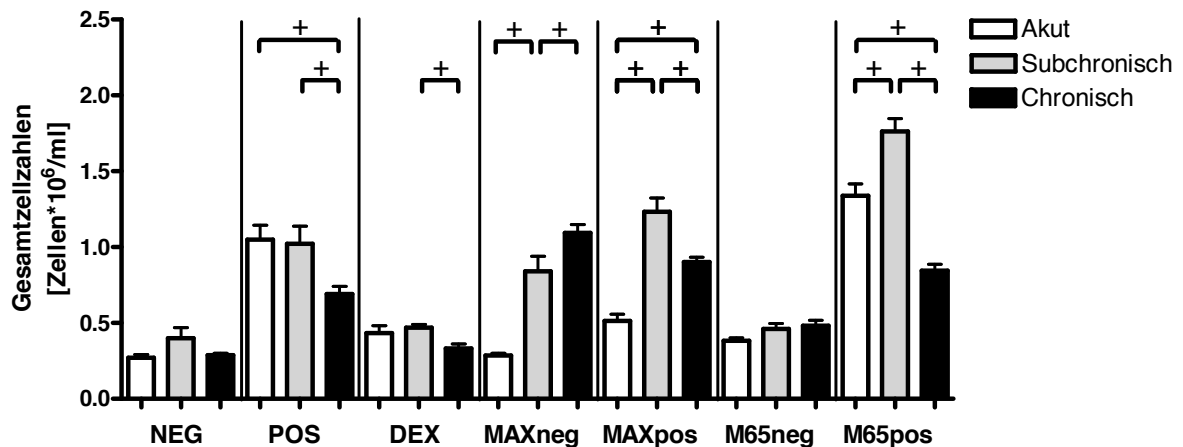


Abb. 21: Verlaufsgraphen der Gesamtzellzahlen der BALF einzelner Gruppen zu allen drei Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; += $p \leq 0,05$.

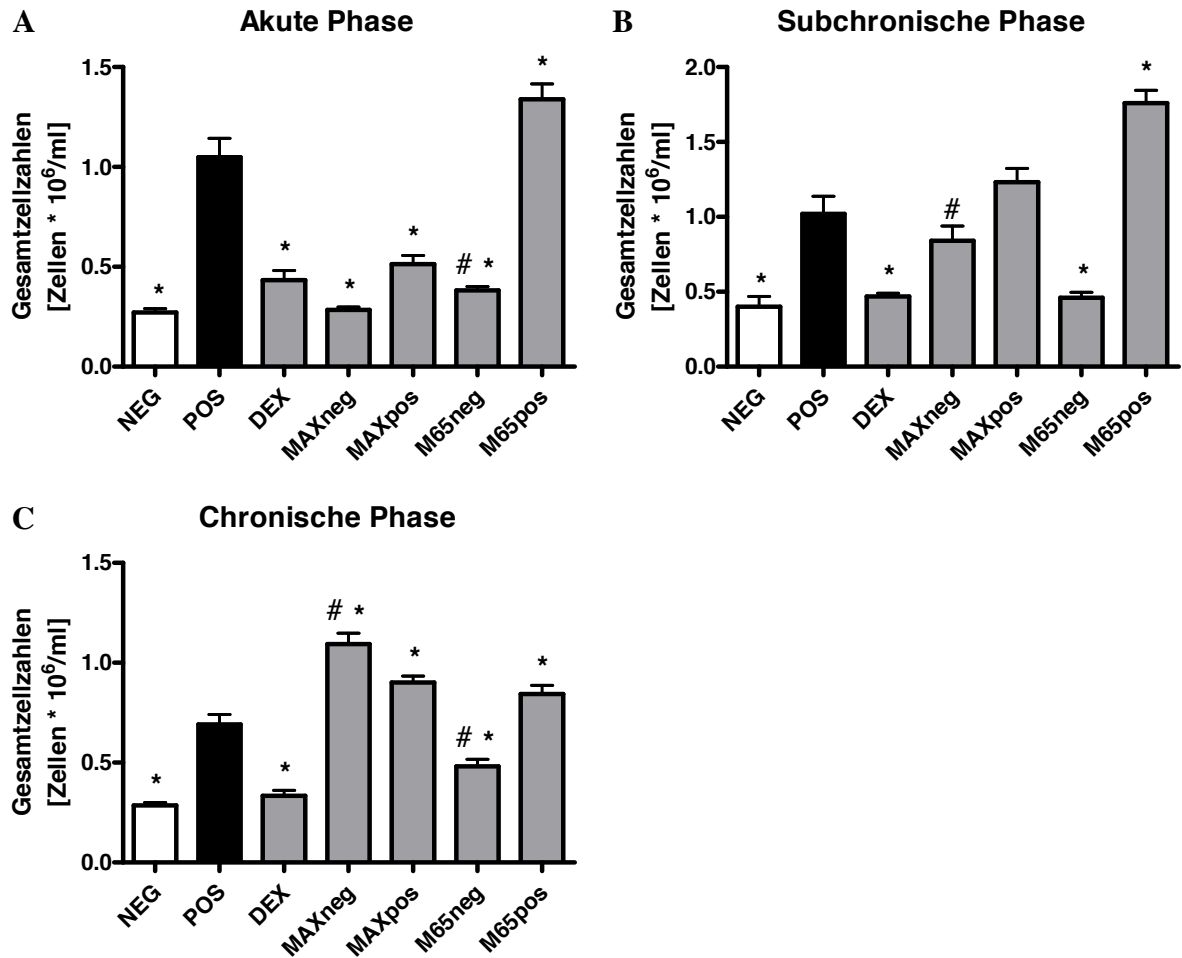


Abb. 22: Gesamtzellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; akute Phase (A), subchronische Phase (B), chronische Phase (C); NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.

Die Verläufe der Makrophagenzellzahlen in den einzelnen Gruppen waren, abgesehen von den Maxadilan behandelten Gruppen, über den Versuch hinweg vergleichsweise konstant, wobei die Negativkontrollgruppe nur in der akuten Phase einen Unterschied zur Positivkontrollgruppe zeigte. Die Dexamethasonbehandlung hatte keinen Effekt auf die Zellzahlen der Makrophagen (Tab. 3). In der MAXneg Gruppe und der MAXpos Gruppe waren von der akuten zur subchronischen Phase jeweils ein Anstieg der

Makrophagenzellzahlen zu sehen. Von der subchronischen zur chronischen Phase wurde keine signifikante Änderung festgestellt.

Beide Maxadilan behandelten Gruppen waren in der chronischen Phase gegenüber der Positivkontrolle signifikant erhöht. Die M65pos Gruppe war zu allen drei Messzeitpunkten gegenüber der Positivkontrollgruppe signifikant erhöht, während die M65neg Gruppe keine Unterschiede zur Negativkontrollgruppe aufwies.

Tabelle 3: Makrophagen Zellzahlen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten

*Makrophagenzellzahlen [Zellen*10⁶/ml]; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= p≤ 0,05 im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, #= p≤ 0,05 im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.*

	NEG	POS	DEX	MAXneg	MAXpos	M65neg	M65pos
Akut	* 0,236 ± 0,016	0,336 ± 0,042	0,265 ± 0,011	0,253 ± 0,013	0,274 ± 0,024	0,258 ± 0,021	* 0,449 ± 0,041
Subchronisch	0,360 ± 0,062	0,269 ± 0,037	0,271 ± 0,020	0,408 ± 0,057	0,387 ± 0,045	0,270 ± 0,031	* 0,465 ± 0,060
Chronisch	0,245 ± 0,015	0,296 ± 0,023	0,227 ± 0,017	*# 0,510 ± 0,025	* 0,429 ± 0,026	0,256 ± 0,024	* 0,388 ± 0,030

Während die Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten bei der Negativkontrollgruppe, der Positivkontrollgruppe und der Dexamethason behandelten Gruppe über die Dauer des Versuchs keine Veränderungen zeigten, nahmen die Neutrophilenzahlen der vier Maxadilan und M65 behandelten Gruppen mit zunehmender Versuchsdauer zu (Abb. 23). Die Negativkontrollgruppe und die Dexamethason behandelte Gruppe zeigten über den Versuch im Vergleich zur Positivkontrollgruppe zu jedem Messzeitpunkt eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten (Abb. 24A-C). Die Maxadilanbehandlung hatte in der akuten Phase keine Auswirkungen auf die Zellzahlen der neutrophilen Granulozyten. In der subchronischen und chronischen Phase überstiegen die Zellzahlen beider Maxadilan behandelten Gruppen jedoch die Werte der Positivkontrollgruppe deutlich. Die M65neg Gruppe lag mit der Positivkontrollgruppe zu allen Phasen auf gleichem Niveau, während die

M65pos Gruppe in der subchronischen und chronischen Phase die Zellzahlen der Positivkontrollgruppe signifikant übertraf.

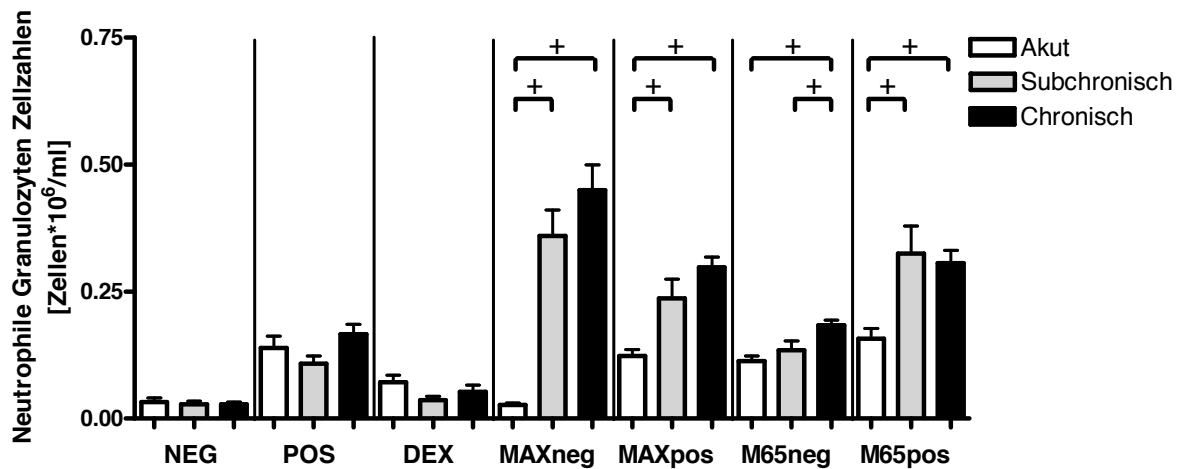


Abb. 23: Verlaufsgraphen der neutrophilen Granulozyten Zellzahlen der BALF einzelner Gruppen zu allen drei Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; += $p \leq 0,05$.

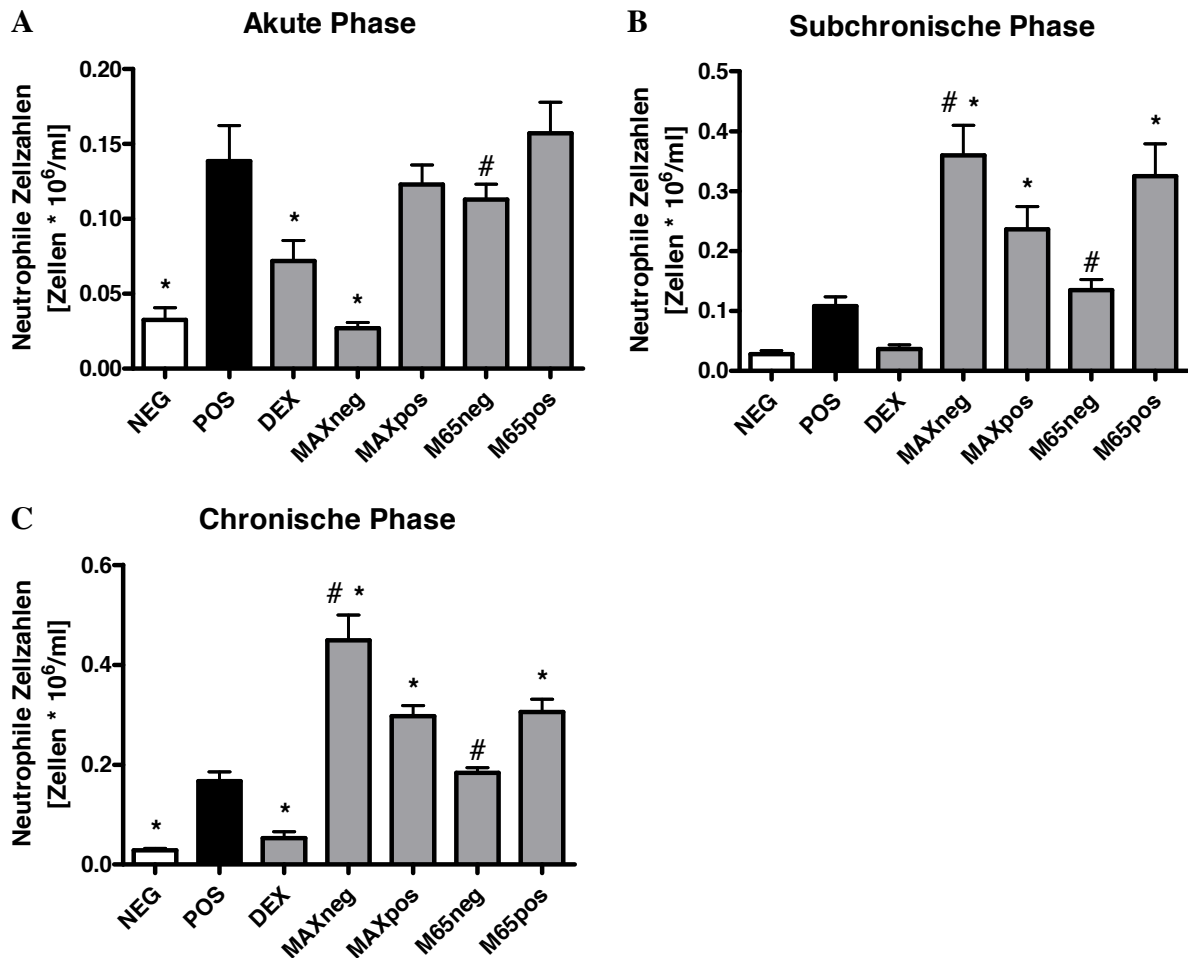


Abb. 24: Neutrophile Granulozyten Zellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; akute Phase (A), subchronische Phase (B), chronische Phase (C); NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.

Die Zellzahlen der eosinophilen Granulozyten waren in der Positivkontrollgruppe gegenüber der Negativkontrollgruppe und der Dexamethason behandelten Gruppe zu allen Messzeitpunkten erhöht. Dabei waren sie in der chronischen Phase deutlich niedriger als in der akuten und subchronischen Phase (Abb. 25, 26A-C). Die Maxadilan Behandlung führte in der MAXpos Gruppe in der akuten und subchronischen Phase zu einer signifikanten Reduktion der eosinophilen Granulozyten im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, obwohl in dieser Gruppe eine starke Zunahme in der BALF von der akuten zur subchronischen Phase zu

verzeichnen war. Die M65pos Gruppe lag mit der Positivkontrollgruppe in der akuten und subchronischen Phase gleich auf. In der MAXneg und der M65neg Gruppe waren keine Effekte zu erkennen.

Aufgrund des starken Absinkens der eosinophilen Granulozyten Zellzahlen in der Positivkontrollgruppe, der MAXpos Gruppe und der M65pos Gruppe in der chronischen Phase sind zu diesem Zeitpunkt nur vergleichsweise geringe Unterschiede zu anderen Gruppen festzustellen.

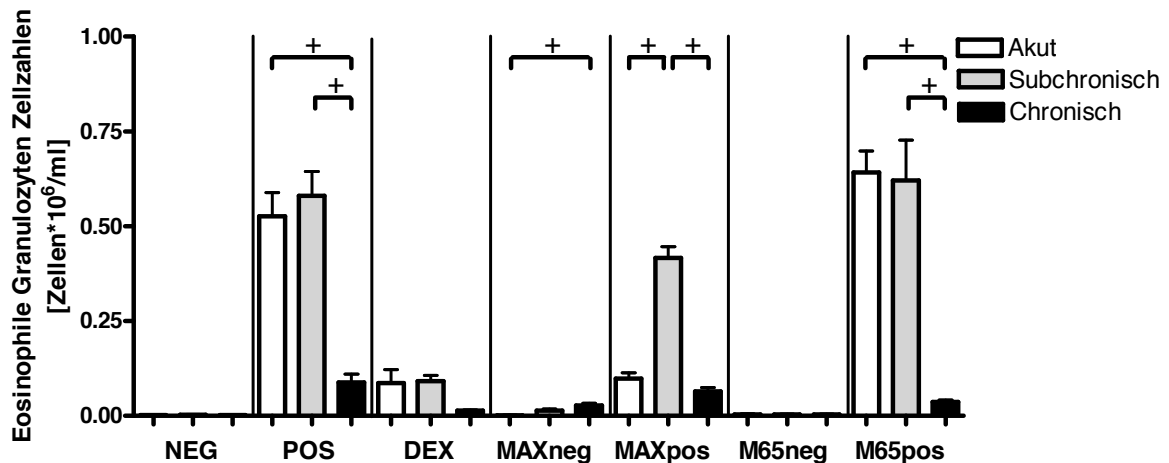


Abb. 25: Verlaufsgraphen der eosinophilen Granulozyten Zellzahlen der BALF einzelner Gruppen zu allen drei Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; += $p \leq 0,05$.

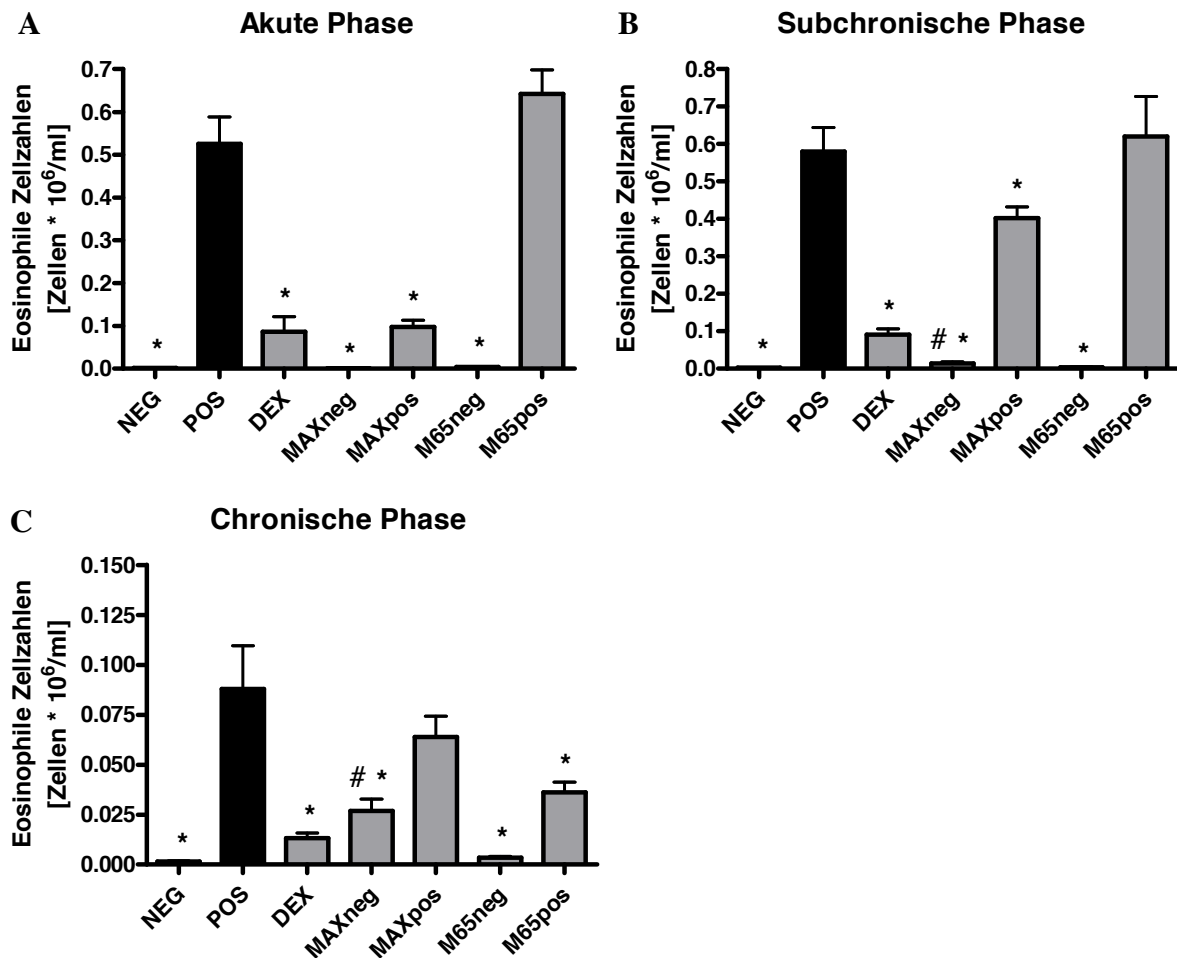


Abb. 26: Eosinophile Granulozyten Zellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; akute Phase (A), subchronische Phase (B), chronische Phase (C); NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.

Die Zellzahlen der Lymphozyten stiegen bei der Positivkontrollgruppe, der Negativkontrollgruppe und der Dexamethason behandelten Gruppe mit zunehmender Versuchsdauer an (Tab. 4). Das gleiche Bild zeigte sich bei beiden Maxadilan behandelten Gruppen und der M65neg Gruppe, wohingegen die M65pos Gruppe von der akuten zur subchronischen Phase deutlich ansteigt und anschließend wieder auf das Niveau der akuten Phase abfiel. Die Maxadilan Behandlung zeigte in der akuten Phase und der subchronischen Phase im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine Effekte. Lediglich in der chronischen Phase

wurde eine Erhöhung der Lymphozyten der MAXneg Gruppe im Vergleich zur Negativkontrollgruppe beobachtet. Die M65pos Gruppe war in der akuten und subchronischen Phase erhöht, fiel in der chronischen Phase jedoch auf das Niveau der Positivkontrollgruppe.

Tabelle 4: Lymphozyten Zellzahlen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten

*Lymphozytenzellzahlen [Zellen*10⁶/ml]; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.*

	NEG	POS	DEX	MAXneg	MAXpos	M65neg	M65pos
Akut	* 0,002 ± 0,001	0,049 ± 0,008	0,011 ± 0,002	* 0,003 ± 0,001	0,019 ± 0,005	*# 0,008 ± 0,002	* 0,091 ± 0,026
Subchronisch	* 0,007 ± 0,004	0,136 ± 0,017	0,072 ± 0,011	*# 0,060 ± 0,025	0,161 ± 0,019	* 0,030 ± 0,010	* 0,250 ± 0,038
Chronisch	* 0,011 ± 0,002	0,133 ± 0,020	* 0,041 ± 0,005	# 0,108 ± 0,012	0,111 ± 0,012	*# 0,040 ± 0,005	0,113 ± 0,010

Die IL-4 Konzentration der BALF der Negativkontrollgruppe war in der akuten Phase gegenüber der Positivkontrollgruppe reduziert (Tab. 5). In der subchronischen und chronischen Phase war kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen zu erkennen. Die Dexamethasonbehandlung führte zu keiner Reduktion von IL-4, wohingegen die Maxadilanbehandlung eine signifikante Reduktion in der akuten Phase bewirkte. Die M65pos Gruppe zeigte zu allen Messzeitpunkten gegenüber der Positivkontrollgruppe reduzierte IL-4 Konzentrationen.

Die IL-4 Konzentration der BALF nahm über die Dauer des Versuchs bei der Dexamethason behandelten Gruppe, der MAXneg Gruppe und der M65neg Gruppe zu.

Tabelle 5: IL-4 Konzentrationen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten

*IL-4 Konzentrationen [pg/ml]; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.*

	NEG	POS	DEX	MAXneg	MAXpos	M65neg	M65pos
Akut	* 96,0 ± 10,6	132,6 ± 6,6	121,5 ± 11,7	*102,0 ± 9,4	*97,6 ± 4,1	117,9 ± 11,9	* 81,0 ± 9,6
Subchronisch	102,3 ± 9,5	117,8 ± 11,0	144,5 ± 9,5	# 144,6 ± 8,3	115,3 ± 10,3	*# 169,5 ± 11,1	* 67,8 ± 11,0
Chronisch	123,8 ± 11,2	129,1 ± 7,1	167,8 ± 15,1	135,3 ± 14,2	96,7 ± 7,2	*# 171,0 ± 7,9	* 85,3 ± 12,8

Die Konzentration von IL-5 der Negativkontrollgruppe war lediglich in der akuten Phase niedriger als in der Positivkontrollgruppe (Tab. 6). In der subchronischen und chronischen Phase waren keine Unterschiede festzustellen, was an einer Verringerung der IL-5 Konzentration in der Positivkontrollgruppe in der subchronischen und chronischen Phase begründet ist. Diese konnte ebenfalls bei der MAXpos und der M65pos Gruppe beobachtet werden. Die Behandlungen mit Dexamethason oder Maxadilan schienen im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, abgesehen von einer Erhöhung der MAXneg Gruppe in der chronischen Phase, keine Wirkung auf die IL-5 Konzentration zu haben. Die M65neg Gruppe war zu allen Messzeitpunkten gegenüber der Negativkontrollgruppe erhöht.

Tabelle 6: IL-5 Konzentrationen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten

*IL-5 Konzentrationen [pg/ml]; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.*

	NEG	POS	DEX	MAXneg	MAXpos	M65neg	M65pos
Akut	* 88,0 ± 10,5	175,5 ± 10,4	158,2 ± 12,9	*119,1 ± 11,1	143,3 ± 8,2	#184,5 ± 19,3	* 119,6 ± 7,7
Subchronisch	82,9 ± 6,8	104,3 ± 8,8	* 158,6 ± 8,4	99,9 ± 8,4	112,0 ± 5,8	*# 137,1 ± 6,4	85,1 ± 8,6
Chronisch	116,7 ± 10,9	101,2 ± 4,8	* 166,7 ± 7,2	127,3 ± 10,3	88,7 ± 6,6	*# 156,2 ± 6,3	77,4 ± 6,5

Bei Eotaxin-2 wurden bei Betrachtung der einzelnen Gruppen zwischen der akuten und der chronischen Phase in allen Gruppen Reduktionen festgestellt (Abb. 27). Die Positivkontrollgruppe fiel von hohen Werten in der akuten und subchronischen Phase in der chronischen Phase auf das niedrige Niveau der Negativkontrollgruppe, die (Abb. 28A-C). Sowohl die Behandlung mit Dexamethason, als auch mit Maxadilan führten zu einer starken Reduktion von Eotaxin-2 in der akuten und der subchronischen Phase. Aufgrund der Reduktion in der Positivkontrollgruppe zum chronischen Messzeitpunkt ließ sich dieser Effekt in dieser Phase nicht erkennen. Die M65 Behandlung schien in der akuten und subchronischen Phase keinen Einfluss auf die Eotaxin-2 Sekretion zu haben während die Eotaxin-2 Konzentrationen der chronischen Phase deutlich höher als die Werte der Positivkontrolle waren.

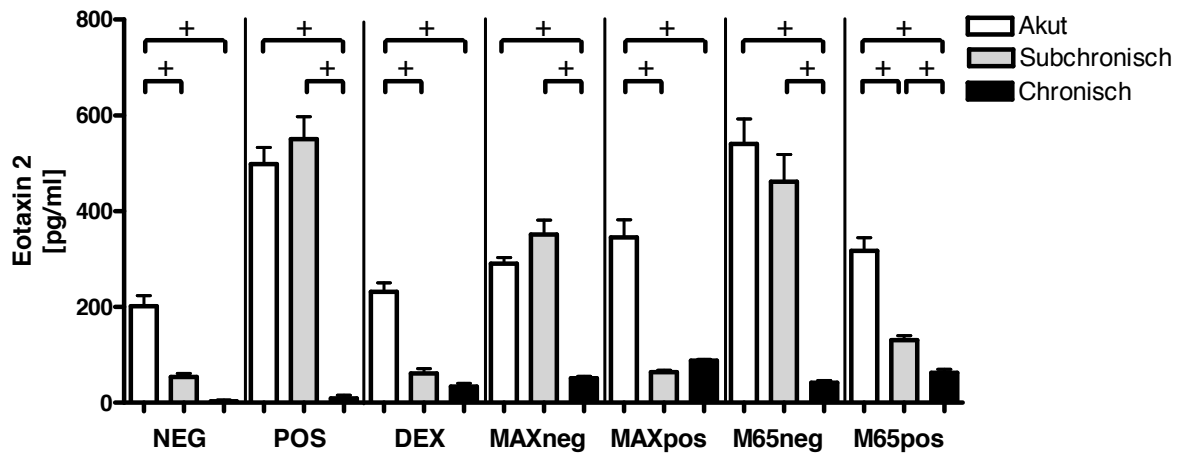


Abb. 27: Verlaufsgraphen der Eotaxin-2 Konzentrationen der BALF einzelner Gruppen zu allen drei Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; += $p \leq 0,05$.

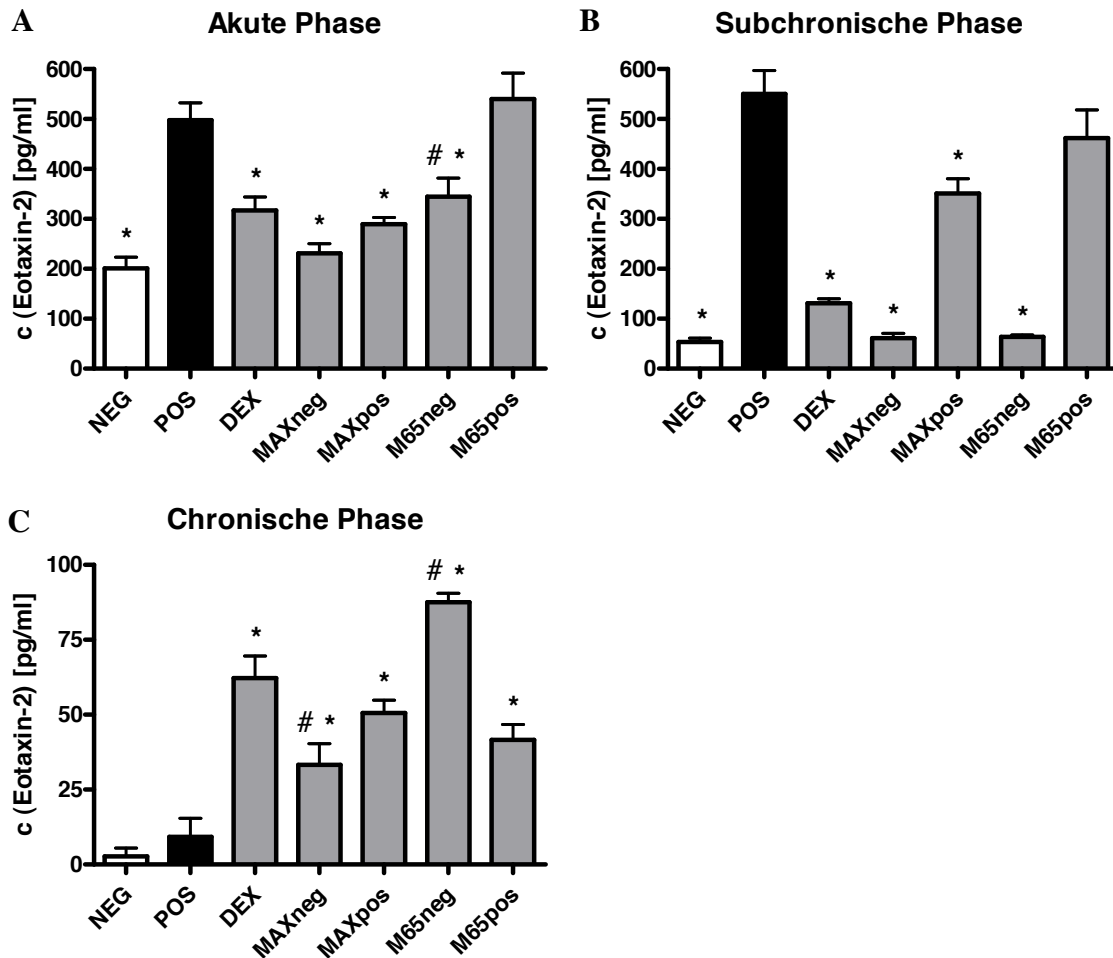


Abb. 28: Eotaxin-2 Konzentrationen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten; Mittelwerte und SEM; akute Phase (A), subchronische Phase (B), chronische Phase (C); NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, # = $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.

3.3.4 Lungenfunktion Verlauf

Bei der Messung der ED50 zeigte keine der Gruppen signifikante Veränderungen im Verlauf des Versuchs (Tab. 7).

In der akuten und der subchronischen Phase wiesen die Negativkontrollgruppe und die Dexamethason behandelte Gruppe eine höhere ED 50 auf als die Positivkontrollgruppe. In der Negativkontrollgruppe war dieser Unterschied auch in der chronischen Phase vorhanden. Die Behandlungen mit Maxadilan und M65 wiesen keine signifikanten Effekte auf.

Tabelle 7: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten

*Effective Dose 50 MCh [mg]; Mittelwerte und SEM; NEG= Negativkontrollgruppe, POS= Positivkontrollgruppe, DEX= Dexamethason behandelte Gruppe, MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65neg= nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe, M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt; *= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Positivkontrollgruppe, #= $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Negativkontrollgruppe.*

	NEG	POS	DEX	MAXneg	MAXpos	M65neg	M65pos
Akut	*18,51 ± 1,82	12,97 ± 2,07	*19,89 ± 3,50	17,45 ± 2,25	11,30 ± 1,95	*18,15 ± 2,23	13,75 ± 2,46
Subchronisch	* 25,33 ± 3,99	10,10 ± 1,73	*19,21 ± 3,19	*16,90 ± 2,53	11,74 ± 1,33	* 25,51 ± 2,18	13,36 ± 1,90
Chronisch	* 24,81 ± 3,34	11,81 ± 1,69	14,54 ± 1,61	*19,13 ± 2,15	14,73 ± 2,27	* 24,61 ± 3,18	13,20 ± 2,05

3.3.5 Immunogenität der Testsubstanzen

Um Immunreaktionen gegen die Testsubstanzen Maxadilan und M65 zu detektieren wurde ein Immunassay zur relativen Bestimmung der Maxadilan und M65 spezifischen Antikörper durchgeführt. Dazu wurden analog zur ELISA Technik die Testsubstanzen Maxadilan und M65 an 96 Well Platten gebunden. Anschließend sollten Maxadilan bzw. M65 spezifische Antikörper aus dem Plasma der Versuchstiere daran binden und mit einer Farbreaktion anhand der optischen Dichte (OD) detektiert werden. Der Assay wurde durch das Auftragen einer 1:2 Verdünnungsreihe auf seine Verdünnungsechtheit geprüft. Es wurden Plasmaproben

aller Gruppen getestet, wobei es nur bei Proben der Maxadilan oder M65 behandelten Gruppe der subchronischen und chronischen Phase zu einer Farbreaktion kam. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Tiere mit OVA sensibilisiert waren oder nicht. Bei allen anderen Gruppen blieb die Farbreaktion aus und die Ansätze verhielten sich wie die Vehikelkontrollen. Für den Test auf Verdünnungsechtheit wurden daher Proben der sensibilisierten Maxadilan bzw. M65 behandelten Gruppe verwendet. Unabhängig davon, ob die Platten mit Maxadilan oder M65 gecoatet waren zeigte sich für beide Gruppen eine Konzentrationsabhängige Farbreaktion des Ansatzes im Bereich zwischen einer Plasma Konzentration von 1:1000 und 1:32000 (Abb. 29A und B).

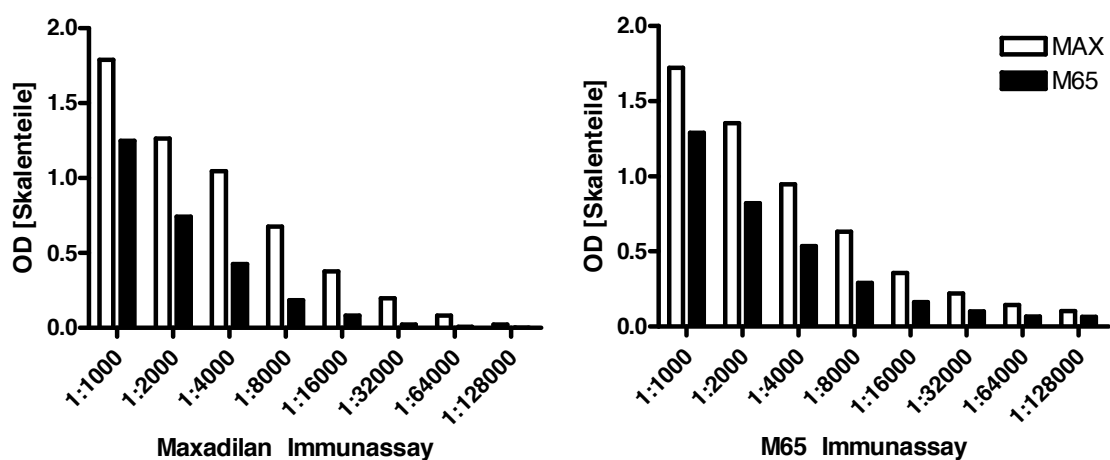


Abb. 29: Plasma Verdünnungen im Maxadilan (A) und M65 (B) Bioassay zur Detektion Maxadilan und M65 spezifischen IgG1; MAX= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe, M65= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe.

Trotz der starken Kreuzreaktivität mit dem Plasma der Maxadilan und der M65 behandelten Gruppen wurden für die Bestimmungen Maxadilan bzw. M65 spezifischer Antikörper mit dem jeweils spezifischen Antigen gearbeitet. Es konnten sowohl für die sensibilisierte, als auch für die nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe in der chronischen Phase Maxadilan spezifisches IgG nachgewiesen werden (Abb. 30A). In der subchronischen Phase waren im Vergleich zur chronischen Phase nur geringe Mengen IgG nachzuweisen, die sich statistisch nicht signifikant von den Ergebnissen in der akuten Phase unterschieden.

Die Messungen für M65 ergaben ein vergleichbares Bild (Abb. 30B). Auch hier könnten starke Reaktionen in der chronischen Phase und schwache in der subchronischen Phase detektiert werden, während in der Vehikelkontrolle so gut wie kein IgG enthalten war. Auch hier war der Unterschied zwischen der akuten und der subchronischen Phase nicht signifikant.

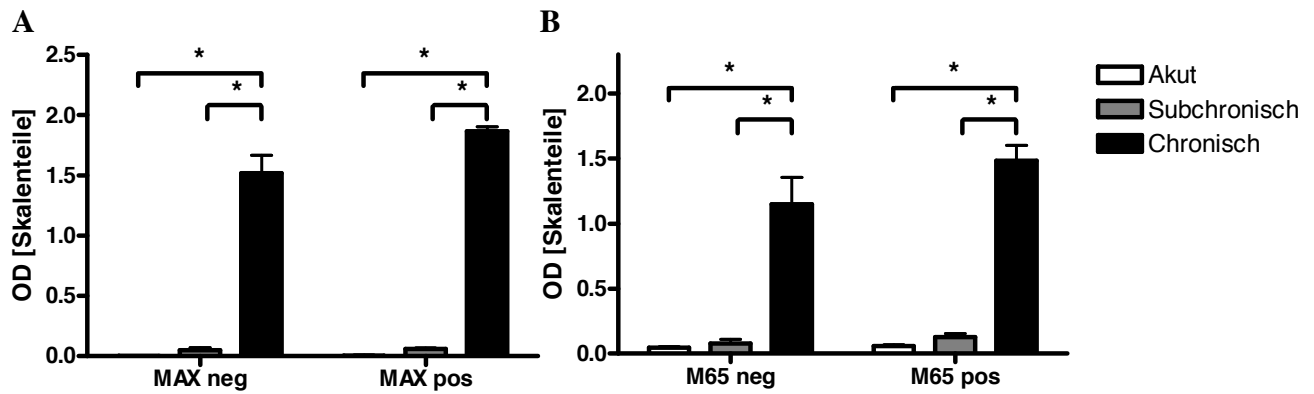


Abb. 30: Ergebnisse Bioassay zur Detektion Maxadilan und M65 spezifischen IgG1; Maxadilan (**A**), M65 (**B**), Mittelwerte und SEM; MAXneg= nicht sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe; MAXpos= sensibilisierte Maxadilan behandelte Gruppe; M65neg=nicht sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; M65pos= sensibilisierte M65 behandelte Gruppe; statistische Signifikanzen wurden mit der one-way analysis of variance mit dem Dunnett post test gegen die Negativkontrollgruppe bestimmt (*= $p < 0,05$).

4 Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der Arbeit sind:

- 1) Der PAC1 Rezeptor wird in pulmonalen DC exprimiert
- 2) Agonisierung des PAC1 Rezeptors induziert in der akuten und subchronischen Phase der Modelle starke antiinflammatorische Effekte
- 3) Maxadilan und M65 wirken bei langfristiger Applikation immunogen
- 4) Weder Agonisierung noch Antagonisierung des PAC1 Rezeptors beeinflusste die AHR.

4.1 Expression von PAC1 in der Lunge

Die Expression von PAC1 im Lungengewebe lässt auf eine Reaktivität der Lunge auf die Behandlung mit Maxadilan schließen. Als Effektorzellen für antiinflammatorische Wirkungen nach einer Stimulation mit den endogenen Liganden VIP oder PACAP werden in der Literatur mehrere Zielzellen genannt. VIP und PACAP induzierte antiinflammatorische Effekte in Bezug auf Zytokinfreisetzung und die Expression kostimulierender Moleküle wurden bei T-Zellen (105), Makrophagen (106), Monozyten (107) und DC (108) beschrieben, wobei durch das Binden von VIP und PACAP an alle drei Rezeptoren des VIP/PACAP Systems keine Zuordnung auf einzelne Rezeptoren möglich war. In der durchgeführten Expressionsanalyse wurden daher isolierte Populationen von T-Zellen, Makrophagen und DC auf die Expression von PAC1 untersucht. Die Expression von PAC1 konnte nur auf DC nachgewiesen werden. Pulmonale DC stellen dadurch mögliche Effektorzellen dar, die durch Maxadilan stimuliert werden könnten.

4.2 Antiinflammatorische Effekte durch PAC1 Agonisierung

Da für die endogenen Liganden VIP und PACAP sowie für den spezifischen PAC1 Liganden Maxadilan in *in vitro* Ansätzen bereits antiinflammatorische Effekte gezeigt wurden (109), wurden die Maxadilan induzierten Effekte *in vivo* in Modellen für allergisches Asthma getestet. Für die Prüfung wurden ein akutes und ein chronisches murines Asthmodell

verwendet. Das akute Modell ist bereits etabliert (110-112) und diente zur Untersuchung der Wirkung in der akuten allergischen Entzündung der Lunge. Humanes Asthma stellt allerdings eine chronische Erkrankung dar. Daher wurde in dem Projekt zusätzlich ein chronisches Modell verwendet, in dem eine akute, eine subchronische und eine chronische Phase dargestellt werden können. In beiden Modellen ließen sich in der akuten und subchronischen Phase wesentliche Merkmale des allergischen Asthmas, wie eine erhöhte Eosinophilie, eine Erhöhung Th2 gerichteter Zytokine und eine AHR darstellen. Die Auslenkbarkeit des Systems wurde mit dem in der Asthmatherapie etablierten Glucocorticoid Dexamethason untersucht. Dexamethason induzierte in beiden Studien einen Rückgang der Gesamtzellzahlen sowie der eosinophilen Granulozyten. Die AHR wurde in der akuten und subchronischen Phase gegenüber MCh durch Dexamethason verbessert. Diese Ergebnisse bestätigen die Ausprägung und Relevanz der verwendeten Modelle.

Für die beiden endogenen Liganden der Rezeptoren des VIP/PACAP Systems wurden mehrfach antiinflammatorische Effekte beschrieben. So konnte durch die Behandlung mit VIP in einem murinen Modell für septischen Schock die Lebenserwartung der Versuchstiere signifikant gesteigert werden (113) und in einem Kollagen induzierten Arthritis Modell die Entzündung reduziert werden (114). In einem murinen Modell für Morbus Crohn konnten ebenfalls antiinflammatorische Effekte induziert werden (115). Auch PACAP wurde in verschiedenen Modellen für entzündliche Krankheiten getestet und erwies sich in einem Modell für septischen Schock (116), und in Modellen für Colitis (117, 118) als effektiver entzündungshemmender Wirkstoff.

Die antiinflammatorischen Wirkungen des Maxadilans in dem verwendeten Modell für allergisches Asthma ließen sich insbesondere durch die Reduktion eosinophiler Granulozyten als wichtige Markerzellen der allergischen Reaktion darstellen. Diese Ergebnisse konnten anhand der Konzentration von Eotaxin-2 im chronischen Modell bestätigt werden. Die Reduktion der eosinophilen Granulozyten war in der akuten Phase ebenso effektiv wie durch die Behandlung mit Dexamethason.

In dem akuten Modell war die Konzentration von IL-5 und in der akuten Phase des chronischen Modells die von IL-4 in der BALF Maxadilan behandelte Tiere im Vergleich zur Positivkontrollgruppe erniedrigt. IL-4 und IL-5 stellen die Leitzytokine der für Allergien typischen Th2 gerichteten Immunantwort dar (119). Als Hauptquelle für beide Zytokine werden Th2 Zellen angesehen (119). Die Reduktion beider Zytokine spricht für einen Einfluss von Maxadilan auf die Rekrutierung oder die Funktion von Th2 Zellen.

Die Identifizierung von PAC1 RNA in pulmonalen DC legt in dem verwendeten Modell DC als Effektorzellen nahe und lässt die von Richard Titus beobachteten Effekte als mögliche Erklärung dienen (109): Für Knochenmark generierte DC wurden in *in vitro* Versuchen nach Maxadilan Exposition entzündungshemmende Mechanismen dargestellt, die durch eine modifizierte Expression von Oberflächenmolekülen und Änderungen im Zytokinprofil hervorgerufen wurden. Dabei wurde eine reduzierte Freisetzung von TNF- α und IFN- γ sowie eine Erhöhung von IL-10 in Kokultur mit T-Zellen festgestellt. Weiterhin wurde eine reduzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD83 und des Chemokinrezeptors CCR7 beobachtet. CCR7 ist am *DC-Homing* zu den drainierenden Lymphknoten beteiligt. Durch die reduzierte Expression könnte das *DC-Homing* gehemmt werden und so eine Immunantwort hemmen oder zumindest verzögern (Abb. 31). Die Reduktion von CD80 und CD83 könnte zu einer eingeschränkten Fähigkeit der T-Zellaktivierung führen, die ebenfalls in Kokultur von Maxadilan behandelten DC und T-Zellen beobachtet wurde (109). Beide Mechanismen führen zu einer Einschränkung in der Entwicklung einer spezifischen T-Zell vermittelten Immunantwort und können so eine Reduktion von IL-4 und IL-5 verursachen, wie in den verwendeten Modellen beobachtet wurde. Eine verstärkte IL-10 Freisetzung, die auf die Aktivierung regulatorischer T-Zellen hätte schließen lassen, konnte in den durchgeführten Studien nicht gezeigt werden.

Für die VIP und PACAP induzierten immunmodulatorischen Effekte wurden mehrere *Second Messenger* identifiziert, darunter zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (120-122), Phospholipase D (123, 124) und Inositolphosphat (125). Als Wirkmechanismus wurde die Inhibition eines Transkriptionsfaktors mit diesen Effekten in Verbindung gebracht. Die Inhibition von NF κ B wurde nach VIP oder PACAP Exposition in Makrophagen (106), Monozyten (126), Langerhans-Zellen (127) und T-Zellen (128) dargestellt. Über welche Rezeptoren des VIP/PACAP Systems diese Effekte induziert werden und ob die Modifikationen der Oberflächenmoleküle auf DC ebenfalls NF κ B induziert sind, ist hingegen in den Publikationen nicht beschrieben.

Für alle Rezeptoren des VIP/PACAP Systems sind spezifische Agonisten verfügbar, so dass eine Untersuchung spezifischer Effekte zu diesen Rezeptoren auch ohne genetische Modifikationen möglich ist. Maxadilan stellt den spezifischen Agonisten für den PAC1 Rezeptor dar. Für den VPAC1 Rezeptor wurde der spezifische Agonist [K(15), R(16), L(27)] VIP 1-7-GRF 8-27 beschrieben (129) und für den VPAC2-Rezeptor ist der spezifische Agonist Ro25-1553 bekannt (130). [K(15), R(16), L(27)] VIP 1-7-GRF 8-27 und Ro25-1553 wurden beide in einem murinen Modell für septischen Schock auf antiinflammatorische

Effekte getestet und durch beide wurde die Überlebenschance der Versuchstiere verbessert (94). Laut den Autoren wurden die Effekte durch die Reduktion proinflammatorischer Zytokine und die verstärkte Freisetzung von IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin induziert. Zusätzlich wurde eine Reduktion kostimulierender Moleküle wie B7.1 und B7.2 für die Agonisierung des VPAC1-Rezeptors beschrieben. Aufgrund der Reduktion der kostimulierenden Moleküle wurde der VPAC1 Rezeptor von den Autoren als potenterer Immunmodulator vorgeschlagen.

Aufgrund starker bronchodilatatorischer Eigenschaften wurde Ro25-1553 in humanen Studien als Bronchodilator bei allergischem Asthma getestet (93) und induzierte eine ebenso starke Bronchodilatation, wie der etablierte Bronchodilator Formoterol. Allerdings wurde das Peptid aufgrund seiner vergleichsweise geringen Wirkdauer nicht als Therapeutikum etabliert. Durch Acetylierung und PEGylierung stabilisierte VPAC2 Agonisten, wie BAY55-9837 wurden im allergischen Asthma bisher nicht getestet (131). BAY55-9837 wurde zur Behandlung von Diabetes entwickelt, da durch den VPAC2 Rezeptor die Glukosetoleranz erhöht wird. In hoher Dosierung führte BAY55-9837 allerdings zu einem Abfall des Blutdrucks und fand aus diesem Grund keine Verwendung als Therapeutikum. Die Gefahr eines Blutdruckabfalls ist bei der Verwendung von Maxadilan ebenfalls zu befürchten, da Maxadilan durch stark vasodilatatorische Effekte charakterisiert ist (95). Diese Funktion des Maxadilan dürfte die ursprüngliche Funktion im Stechmückenspeichel darstellen um eine gute Durchblutung der Einstichstelle zu gewährleisten. Durch die verbesserte Durchblutung der Einstichstelle wird eine ausreichende Blutmahlzeit gewährleistet. In den Vorstudien zur Dosisfindung konnten in einzelnen Fällen bei hohen Dosen Symptome wie Ödembildung und blutige Durchfälle beobachtet werden. Diese könnten durch austretendes Blutplasma und Schäden der Gefäßwände bei starker Vasodilatation bedingt gewesen sein. Interessanter Weise wurden bei der Behandlung von Asthmatikern mit dem VPAC2 Rezeptor Agonisten RO-25-1553 keine Nebenwirkungen beobachtet. Ro25-1553 wurde aerosolisch appliziert und hatte eine begrenzte Wirkdauer. Nach 5 Stunden konnten keine bronchodilatatorischen Effekte mehr festgestellt werden. Durch die Applikation als Aerosol wurde eine lokale Wirkung in der Lunge induziert, offenbar war entweder die Dosis zu gering um systemische Effekte zu induzieren, oder der Wirkstoff wurde vor dem Erreichen des Blutkreislaufs durch Peptidasen in pharmakologisch unwirksame Spaltprodukte zersetzt.

Im Gegensatz zu der Wirkung von Maxadilan führte die Antagonisierung des PAC1 Rezeptors durch M65 zu proinflammatorischen Ergebnissen. Dies unterstützt die Ergebnisse, welche mit Maxadilan generiert wurden. Im Detail waren die Gesamtzellzahlen

proinflammatorischer Zellen in der BALF und die der Makrophagen in der akuten Phase der chronischen Studie höher als in der Positivkontrollgruppe.

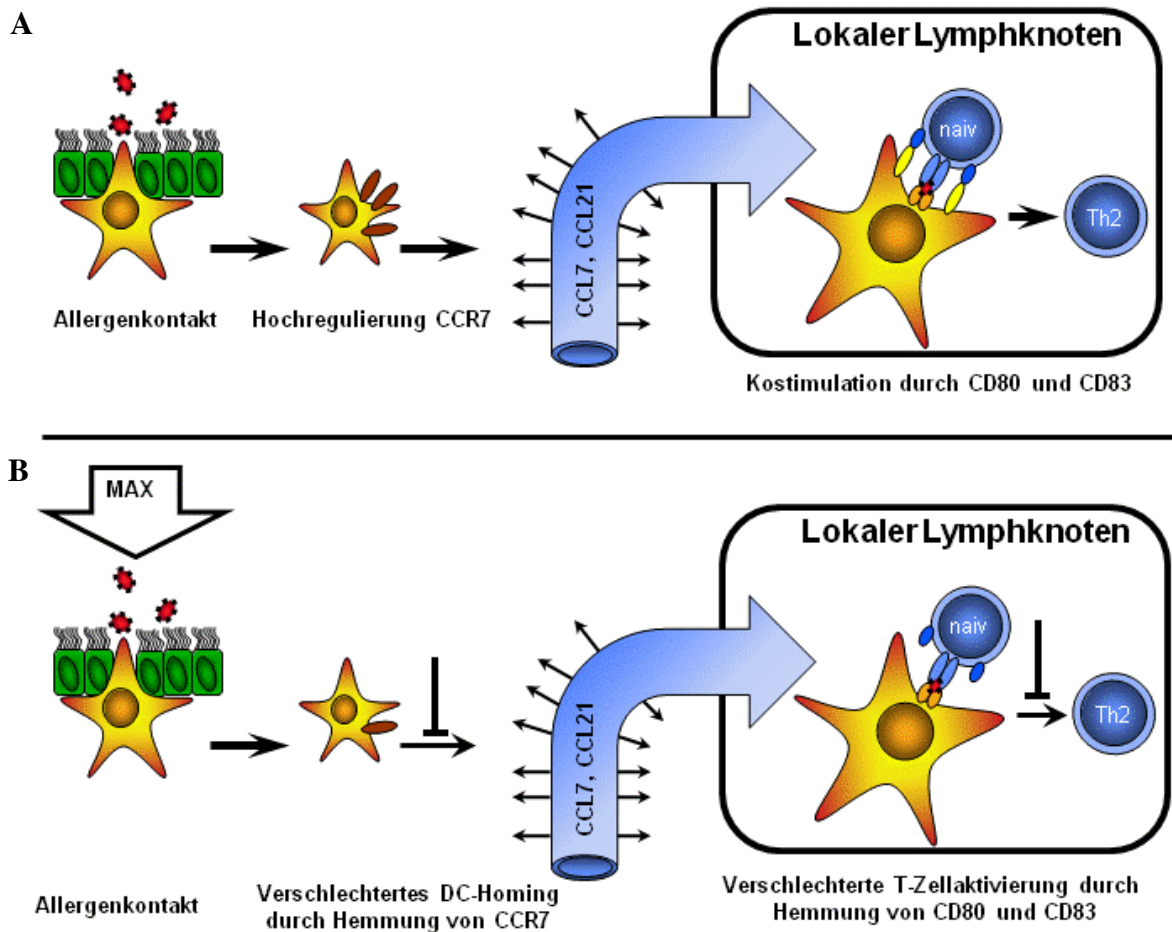


Abb. 31: Schematische Darstellung der Induktion einer Th2 gerichteten Immunreaktion (A) und deren Hemmung durch Maxadilan (B). Durch Aktivierung der PAC1 Rezeptoren auf DC wird eine Hemmung von Homing Rezeptoren und kostimulatorischen Molekülen bewirkt, die einerseits das Einwandern in den Lymphknoten über die Lymphgefäße und andererseits die Aktivierung, Proliferation und Reifung zu Th2-Zellen von T-Zellen in den Lymphknoten hemmen.

4.3 Immunogenität der Peptide Maxadilan und M65

Trotz der erfolgreichen Suppression der allergischen Entzündung in der akuten und subchronischen Phase der Versuche müssen bei der Beurteilung von Maxadilan als Immunmodulator auch die Ergebnisse der chronischen Phase einbezogen werden. In der chronischen Phase klangen die OVA induzierten entzündlichen Mechanismen in allen Ovalbumin sensibilisierten Gruppen ab. In der BALF waren generell nur noch wenige eosinophile Granulozyten und geringe Konzentrationen an Eotaxin-2 und IL-4 zu finden.

Der Effekt des Abklingens einer induzierten allergischen Entzündung über einen Zeitraum von mehreren Wochen, trotz gleichbleibender Allergenexposition wurde bereits zuvor in einigen Fällen für murine Modelle beobachtet (132). Die Reduktion der Immunreaktion wurde dort durch T-Zell vermittelte Toleranz gegenüber dem Allergen erklärt. In der vorliegenden Studie konnte allerdings keine erhöhte IL-10 Konzentration gemessen werden. Der Gehalt an IL-10 fiel in allen Gruppen mit fortschreitendem Versuch ab, obwohl die Entzündungsreaktion noch nachzuweisen war. Als mögliche Toleranzmechanismen könnten also Anergie der OVA spezifischen T-Zellen oder Zell vermittelte IL-10 unabhängige Toleranzmechanismen, wie beispielsweise durch CD4⁺ CD8⁻ Treg vorliegen (133).

In der chronischen Phase waren sowohl in den Maxadilan behandelten Gruppe selbst als auch in den M65 behandelten Gruppen Immunreaktionen zu erkennen. Durch Maxadilan und M65 spezifische Immunassays konnte nachgewiesen werden, dass es sich dabei um spezifische gegen Maxadilan und M65 gerichtete Immunantworten handelte. Es wurde für beide Peptide spezifisches IgG im Plasma Maxadilan bzw. M65 behandelter Tiere nachgewiesen, wobei es unerheblich war, ob die Tiere zuvor auf das Modellallergen OVA sensibilisiert wurden, oder nicht. Maxadilan spezifisches IgG konnte in geringen Konzentrationen in der subchronischen Phase und in höheren Konzentrationen in der chronischen Phase der MAXneg Gruppe und der MAXpos Gruppe nachgewiesen werden, ebenso wie M65 spezifische Antikörper in der M65neg und M65pos Gruppe in der subchronischen und chronischen Phase. Der Umstand, dass auch die MAXneg und die M65neg Gruppe betroffen waren, macht einen Zusammenhang zwischen der allergischen Reaktion auf Ovalbumin und der Maxadilan bzw. M65 Behandlung in Form einer Kosensibilisierung wie in anderen Modellen beschrieben (134) unwahrscheinlich. Die proinflammatorischen Effekte der Maxadilan behandelten Gruppen zum subchronischen und chronischen Zeitpunkt sind also auf immunogene Eigenschaften von Maxadilan und M65 zurückzuführen und von der agonistischen Wirkung auf den PAC1 Rezeptor isoliert zu betrachten. Die PAC1 vermittelte Wirkung des Maxadilans

könnte im Gegenteil durch das Binden von Immunglobulinen beeinträchtigt sein, wodurch die antiinflammatorische Wirkung von Maxadilan über den PAC1 Rezeptor gegenüber der immunogenen des Peptids an sich geschmälert werden würde.

Dadurch ist die Zunahme der Eosinophilie in der subchronischen Phase in der Maxadilan behandelten und OVA sensibilisierten Gruppe trotz der stark antiinflammatorischen Wirkung in der akuten Phase zu erklären. Bevor das Maxadilan den PAC1 Rezeptor aktiviert könnte es durch Maxadilan spezifisches IgG gebunden und inaktiviert werden. Die allergische Entzündung könnte sich daher ohne die PAC1 vermittelte Wirkung des Maxadilans etablieren. In der chronischen Phase, könnte die Eosinophilie wie in der Positivkontrollgruppe durch tolerogene Mechanismen gegenüber OVA wieder abgeklungen sein. Die Immunreaktion gegen Maxadilan bleibt allerdings in Form einer Neutrophilie bestehen.

Dass die Immunreaktion gegen M65 im Vergleich zu Maxadilan die Neutrophilie betreffend niedriger ausgefallen ist, ist mit den eingesetzten Konzentrationen beider Peptide zu erklären. Maxadilan wurde in einer 8mal so hohen Dosis verabreicht wie M65 (siehe Dosisfindung). Demzufolge wurde im Falle der Maxadilan behandelten Gruppen mehr Peptid durch Immunglobuline gebunden und durch das Immunsystem als fremd erkannt. Daher ist die immunologische Antwort entsprechend deutlicher ausgefallen.

In der Literatur lassen sich bislang keine Beispiele finden, in denen Maxadilan über einen ähnlich langen Zeitraum verabreicht wurde. In einer Publikation, in der Maxadilan zur Erhöhung der Glukosetoleranz täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen appliziert wurde, wurden keinerlei Nebenwirkungen beschrieben (135).

4.4 PAC1 induzierte Effekte auf die Lungenfunktion

Obwohl in vielen Modellen eine Verbindung zwischen einer Reduktion der Entzündung und der AHR beschrieben wurde (136, 137), wurde die AHR in den durchgeführten Studien durch den PAC1 Rezeptor nicht beeinflusst. Ein Einfluss von VIP auf die AHR wurde in VIP defizienten Mäusen nachgewiesen (138). In dem Versuch wurde in VIP defizienten Mäusen eine spontane AHR gegenüber MCh nachgewiesen. Doch weder Agonisation noch Antagonisation des PAC1 Rezeptors zeigten detektierbare Abweichungen der AHR von der Positivkontrollgruppe. In der BALF der Maxadilan behandelten Tiere der akuten Studie und der akuten Phase der chronischen Studie wurde zwar die Eosinophilie stark reduziert, es wurden aber auch signifikant erhöhte Zellzahlen für neutrophile Granulozyten im Vergleich

zur Positivkontrollgruppe detektiert. Im Vergleich zur Dexamethason behandelten Gruppe wurde der Influx von Immunzellen in das Lungengewebe durch Maxadilan also weniger effizient unterdrückt. Möglicher Weise wurde ein Einfluss auf die AHR dadurch reduziert. Allerdings wird durch das Ausbleiben einer Verbesserung der AHR eine Beteiligung des PAC1 Rezeptors an den bronchodilatorischen Eigenschaften von VIP und PACAP nicht ausgeschlossen. Da die Lungenfunktionsmessung 26 Stunden nach der letzten Maxadilan bzw. M65 Behandlung durchgeführt wurde ist es unwahrscheinlich, dass zu diesem Zeitpunkt noch wirksames Maxadilan oder M65 in der Lunge verfügbar war. Auf eine weitere Gabe der Testsubstanzen kurz vor der Lungenfunktionsmessung wurde aufgrund einer möglichen Beeinträchtigung der Lungenfunktion durch die Narkose und die instillierte Flüssigkeit verzichtet. Ein direkter Einfluss in Form einer Bronchodilatation konnte bisher nur für den VPAC2 Rezeptor dargestellt werden (93).

4.5 Pharmakologische Bedeutung des PAC1 Rezeptors und Maxadilan

Eine Agonisierung des PAC1 Rezeptors durch Maxadilan induzierte antiinflammatorische Wirkungen. Die durch das Asthmodell induzierte Eosinophilie wurde signifikant unterdrückt. Dabei zeigte sich das Peptid Maxadilan ebenso potent wie das in der Asthmatherapie etablierte Glucocorticoid Dexamethason. Die Induktion positiver Effekte durch Agonisierung stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber einer Antagonisierung negativer Mechanismen dar. Bei einer Antagonisierung wird bei komplexen Mechanismen wie der Pathogenese des allergischen Asthma ein Prozess von vielen antagonisiert um einen positiven Effekt zu erzielen. Dieser Effekt kann allerdings wie beispielsweise bei der Antagonisierung von Tachykininen durch andere Effekte kompensiert werden, so dass es notwendig ist mehrere Zielstrukturen anzugreifen um einen symptomatischen Effekt zu erzielen (71, 72). Im Falle einer Agonisierung werden direkt positive Effekte durch die Aktivierung eines Rezeptors erzielt. In Kombination mit Bronchodilatoren könnte eine Agonisierung des PAC1 Rezeptors als zusätzliche Therapiemaßnahme die allergische Entzündung effektiv reduzieren.

Eine dauerhafte Therapie mit dem getesteten Maxadilan ist jedoch aufgrund seiner immunogenen Eigenschaften nicht sinnvoll. Maxadilan wurde aus dem Speichel der Stechmücke *Lutzomyia longipalpis* isoliert und stellt somit ein für den Menschen fremdes Peptid dar. Trotz der spezifischen Bindung an den PAC1 Rezeptor weist Maxadilan keine

Homologien zu körpereigenen PAC1-Liganden auf und kann somit vom Immunsystem sehr effektiv als fremd erkannt werden. Für eine effektive und dauerhafte PAC1 basierte Therapie wäre die Formulierung nicht immunogener PAC1 Agonisten notwendig. Zusätzlich ist zu beachten, dass eine PAC1 Agonisierung systemische Effekte wie die beschriebene Vasodilatation induzieren kann. Die Anwendung als Therapeutikum ist daher für allergisches Asthma ausschließlich direkt am Wirkort zu empfehlen und es ist bei der Formulierung darauf zu achten, dass die Substanz schnell abgebaut wird bevor sie Blutkreislauf gelangt. Eine aerosolische Applikationsform stellt daher die sinnvollste Darreichungsform dar.

Synthetische Rezeptoragonisten sind für das VIP/PACAP System derzeit nicht verfügbar. Allerdings wurde kürzlich ein synthetischer „*small molecule*“ VPAC2 Rezeptor Antagonist beschrieben (139). Aus 1,67 Millionen Testsubstanzen wurde eine Substanz ermittelt, die VPAC2 induzierte cAMP Akkumulationen inhibiert. Angesichts des potentiellen Nutzen VIP/PACAP basierter Wirkstoffe ist die Weiterentwicklung von Agonisten und Antagonisten für die Rezeptoren des VIP/PACAP Systems sinnvoll.

Der PAC1 Rezeptor bietet einen effektiven Mechanismus in die allergische Entzündung des allergischen Asthma agonistisch einzugreifen. Allerdings ist das Peptid Maxadilan zum therapeutischen Einsatz aufgrund der immunogenen Eigenschaften ungeeignet.

5 Anhang

A1 Literaturverzeichnis

1. WHO. 2008. Asthma. May 2008 ed. WHO Media Centre.
2. Renz, H., N. Blumer, S. Virna, S. Sel, and H. Garn. 2006. The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem.Immunol Allergy* 91:30-48.
3. R. Buhl, D. B., C.P. Criece, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnissen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascga, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wettengel, H. Worth. 2006. Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma. *Pneumologie* 60:44.
4. Busse, W. W., and R. F. Lemanske, Jr. 2001. Asthma. *N Engl.J Med* 344:350-362.
5. Davies, K. H., and S. G. O. Johansson. 2006. EAACI Allergie und Definition.
6. Galli, S. J., M. Tsai, and A. M. Piliponsky. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
7. Larche, M., C. A. Akdis, and R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:761-771.
8. Lopez-Vidriero, M. T., I. Das, A. P. Smith, R. Picot, and L. Reid. 1977. Bronchial secretion from normal human airways after inhalation of prostaglandin F2alpha, acetylcholine, histamine, and citric acid. *Thorax* 32:734-739.
9. Nakae, S., L. H. Ho, M. Yu, R. Monteforte, M. Iikura, H. Suto, and S. J. Galli. 2007. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* 120:48-55.
10. Teran, L. M. 2000. CCL chemokines and asthma. *Immunol Today* 21:235-242.
11. Broide, D. H. 2001. Molecular and cellular mechanisms of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 108:S65-S71.
12. Bloemen, K., S. Verstraelen, R. Van Den Heuvel, H. Witters, I. Nelissen, and G. Schoeters. 2007. The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol Lett* 113:6-18.
13. Elias, J. A. 2000. Airway remodeling in asthma. Unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 161:S168-171.
14. Beeken, W., I. Northwood, C. Beliveau, and D. Gump. 1987. Phagocytes in cell suspensions of human colon mucosa. *Gut* 28:976-980.

15. Komiya, A., H. Nagase, H. Yamada, T. Sekiya, M. Yamaguchi, Y. Sano, N. Hanai, A. Furuya, K. Ohta, K. Matsushima, O. Yoshie, K. Yamamoto, and K. Hirai. 2003. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 225:91-100.
16. Rokudai, A., Y. Terui, R. Kuniyoshi, Y. Mishima, E. Aizu-Yokota, Y. Sonoda, T. Kasahara, and K. Hatake. 2006. Differential regulation of eotaxin-1/CCL11 and eotaxin-3/CCL26 production by the TNF-alpha and IL-4 stimulated human lung fibroblast. *Biol Pharm Bull* 29:1102-1109.
17. Ying, S., D. S. Robinson, Q. Meng, J. Rottman, R. Kennedy, D. J. Ringler, C. R. Mackay, B. L. Daugherty, M. S. Springer, S. R. Durham, T. J. Williams, and A. B. Kay. 1997. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol* 27:3507-3516.
18. Baraniuk, J. N. 1997. Pathogenesis of allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 99:S763-772.
19. Holgate, S. T. 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38:872-897.
20. Barnes, P. J. 1986. Asthma as an axon reflex. *Lancet* 1:242-245.
21. Widdicombe, J. G. 2003. Overview of neural pathways in allergy and asthma. *Pulm.Pharmacol Ther.* 16:23-30.
22. Crimi, N., R. Oliveri, R. Polosa, G. Pulvirenti, G. Prosperini, F. Palemo, and A. Mistretta. 1993. Effect of oral terfenadine on bronchoconstrictor response to inhaled neurokinin A and histamine in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 6:1462-1467.
23. Advenier, C., V. Lagente, and E. Boichot. 1997. The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. *Eur Respir J* 10:1892-1906.
24. Humbles, A. A., C. M. Lloyd, S. J. McMillan, D. S. Friend, G. Xanthou, E. E. McKenna, S. Ghiran, N. P. Gerard, C. Yu, S. H. Orkin, and C. Gerard. 2004. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305:1776-1779.
25. Lipscomb, M. F., and B. J. Masten. 2002. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82:97-130.
26. Berend, N., C. M. Salome, and G. G. King. 2008. Mechanisms of airway hyperresponsiveness in asthma. *Respirology* 13:624-631.
27. Meurs, H., R. Gosens, and J. Zaagsma. 2008. Airway hyperresponsiveness in asthma: lessons from in vitro model systems and animal models. *Eur Respir J* 32:487-502.
28. Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu.Rev Immunol* 17:255-281.

29. Kraneveld, A. D., G. Folkerts, A. J. Van Oosterhout, and F. P. Nijkamp. 1997. Airway hyperresponsiveness: first eosinophils and then neuropeptides. *Int J Immunopharmacol.* 19:517-527.
30. Spina, D., and C. P. Page. 2002. Asthma -- a need for a rethink? *Trends Pharmacol Sci* 23:311-315.
31. Ritz, T., A. Steptoe, S. DeWilde, and M. Costa. 2000. Emotions and stress increase respiratory resistance in asthma. *Psychosom.Med* 62:401-412.
32. McQuaid, E. L., G. K. Fritz, J. H. Nassau, M. K. Lilly, A. Mansell, and R. B. Klein. 2000. Stress and airway resistance in children with asthma. *J Psychosom.Res* 49:239-245.
33. Joos, G. F. 1989. The role of sensory neuropeptides in the pathogenesis of bronchial asthma. *Clin Exp Allergy* 19 Suppl 1:9-13.
34. Veres, T. Z., S. Rochlitzer, and A. Braun. 2009. The role of neuro-immune cross-talk in the regulation of inflammation and remodelling in asthma. *Pharmacol Ther.*
35. Lerch, E., and U. R. Muller. 1998. Long-term protection after stopping venom immunotherapy: results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol* 101:606-612.
36. Cramer, R. 2007. Allergy vaccines: dreams and reality. *Expert Rev Vaccines* 6:991-999.
37. Buhl, R., and K. M. Beeh. 2003. [Specific immunotherapy for allergic asthma?]. *Pneumologie* 57:69-70.
38. Buhl, R., D. Berdel, C. P. Criege, A. Gillissen, P. Kardos, C. Kroegel, W. Leupold, H. Lindemann, H. Magnussen, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, K. Rabe, M. Rolke, G. Schultze-Werninghaus, H. Sitter, D. Ukena, C. Vogelmeier, T. Welte, R. Wettengel, and H. Worth. 2006. [Guidelines for diagnosis and treatment of asthma patients]. *Pneumologie* 60:139-177.
39. Abramson, M. J., R. M. Puy, and J. M. Weiner. 2003. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001186.
40. Kaplan, A. P. 2001. Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 124:423-431.
41. Barnes, P. J., and I. M. Adcock. 2003. How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern.Med* 139:359-370.
42. Lewis-Tuffin, L. J., and J. A. Cidlowski. 2006. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069:1-9.

43. Tao, T., J. Lan, G. L. Lukacs, R. J. Hache, and F. Kaplan. 2006. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 35:668-680.
44. Goldfarb, D. S., A. H. Corbett, D. A. Mason, M. T. Harreman, and S. A. Adam. 2004. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* 14:505-514.
45. Ito, K., P. J. Barnes, and I. M. Adcock. 2000. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol* 20:6891-6903.
46. Barnes, P. J., and I. M. Adcock. 2009. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 373:1905-1917.
47. Barnes, P. J. 2006. Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 27:413-426.
48. Adcock, I. M. 2001. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* 14:211-219.
49. Anderson, P., K. Phillips, G. Stoecklin, and N. Kedersha. 2004. Post-transcriptional regulation of proinflammatory proteins. *J Leukoc Biol* 76:42-47.
50. Barnes, P. J. 2006. Corticosteroids: the drugs to beat. *Eur J Pharmacol* 533:2-14.
51. Moore, W. C., E. R. Bleeker, D. Curran-Everett, S. C. Erzurum, B. T. Ameredes, L. Bacharier, W. J. Calhoun, M. Castro, K. F. Chung, M. P. Clark, R. A. Dweik, A. M. Fitzpatrick, B. Gaston, M. Hew, I. Hussain, N. N. Jarjour, E. Israel, B. D. Levy, J. R. Murphy, S. P. Peters, W. G. Teague, D. A. Meyers, W. W. Busse, and S. E. Wenzel. 2007. Characterization of the severe asthma phenotype by the National Heart, Lung, and Blood Institute's Severe Asthma Research Program. *J Allergy Clin Immunol* 119:405-413.
52. D. Berdel, R. B., R. Dierksmann, W. Niebling, K. Schultz, D. Ukena, H. Worth. 2008. Patienten Leitlinie Asthma. *Programm für Nationale Versorgungsleitlinien*.
53. Germonpre, P. R., G. R. Bullock, B. N. Lambrecht, D. V. V. Van, W. H. Luyten, G. F. Joos, and R. A. Pauwels. 1999. Presence of substance P and neurokinin 1 receptors in human sputum macrophages and U-937 cells. *Eur Respir J* 14:776-782.
54. Klassert, T. E., F. Pinto, M. Hernandez, M. L. Candenias, M. C. Hernandez, J. Abreu, and T. A. Almeida. 2008. Differential expression of neurokinin B and hemokinin-1 in human immune cells. *J Neuroimmunol*. 196:27-34.
55. Stewart, J. P., A. Kipar, H. Cox, C. Payne, S. Vasiliou, and J. P. Quinn. 2008. Induction of tachykinin production in airway epithelia in response to viral infection. *PLoS ONE* 3:e1673.
56. Fischer, A., G. P. McGregor, A. Saria, B. Philippin, and W. Kummer. 1996. Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose primary afferent neurons by allergic airway inflammation. *J Clin Invest* 98:2284-2291.

57. Heppt, W., C. Peiser, A. Cryer, Q. T. Dinh, M. Zweng, C. Witt, A. Fischer, and D. A. Groneberg. 2002. Innervation of human nasal mucosa in environmentally triggered hyperreflexic rhinitis. *J Occup. Environ Med* 44:924-929.
58. Lundberg, J. M., T. Hokfelt, C. R. Martling, A. Saria, and C. Cuello. 1984. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res* 235:251-261.
59. Janelins, B. M., A. R. Mathers, O. A. Tkacheva, G. Erdos, W. J. Shufesky, A. E. Morelli, and A. T. Larregina. 2008. Pro-inflammatory tachykinins that signal through the neurokinin 1 receptor promote survival of dendritic cells and potent cellular immunity. *Blood*.
60. Boot, J. D., S. de Haas, S. Tarasevych, C. Roy, L. Wang, D. Amin, J. Cohen, P. J. Sterk, B. Miller, A. Paccaly, J. Burggraaf, A. F. Cohen, and Z. Diamant. 2007. Effect of an NK1/NK2 receptor antagonist on airway responses and inflammation to allergen in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 175:450-457.
61. Maggi, C. A., A. Giachetti, R. D. Dey, and S. I. Said. 1995. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol Rev* 75:277-322.
62. Nakanishi, S., Y. Nakajima, and Y. Yokota. 1993. Signal transduction and ligand-binding domains of the tachykinin receptors. *Regul. Pept.* 46:37-42.
63. Frossard, N., and C. Advenier. 1991. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci* 49:1941-1953.
64. Devillier, P., G. M. Acker, C. Advenier, J. Marsac, D. Regoli, and N. Frossard. 1992. Activation of an epithelial neurokinin NK-1 receptor induces relaxation of rat trachea through release of prostaglandin E2. *J Pharmacol Exp Ther* 263:767-772.
65. Joos, G. F., P. R. Germonpre, and R. A. Pauwels. 2000. Role of tachykinins in asthma. *Allergy* 55:321-337.
66. Komatsu, T., M. Yamamoto, K. Shimokata, and H. Nagura. 1991. Distribution of substance P-immunoreactive and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in normal human lungs. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 95:23-28.
67. Martling, C. R., E. Theodorsson-Norheim, and J. M. Lundberg. 1987. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci* 40:1633-1643.
68. Laitinen, L. A., A. Laitinen, and T. Haahtela. 1992. A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a beta 2-agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 90:32-42.
69. Frossard, N., K. J. Rhoden, and P. J. Barnes. 1989. Influence of epithelium on guinea pig airway responses to tachykinins: role of endopeptidase and cyclooxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* 248:292-298.

70. Watson, N., J. Maclagan, and P. J. Barnes. 1993. Endogenous tachykinins facilitate transmission through parasympathetic ganglia in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol* 109:751-759.
71. Tsuchida, H., S. Takahashi, E. Nosaka, T. Kuraya, M. Yamashita, and K. Morimoto. 2008. Novel triple neurokinin receptor antagonist CS-003 inhibits respiratory disease models in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 596:153-159.
72. Schelfhout, V., R. Louis, W. Lenz, R. Heyrman, R. Pauwels, and G. Joos. 2006. The triple neurokinin-receptor antagonist CS-003 inhibits neurokinin A-induced bronchoconstriction in patients with asthma. *Pulm.Pharmacol Ther* 19:413-418.
73. Springer, J., P. Geppetti, A. Fischer, and D. A. Groneberg. 2003. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator. *Pulm.Pharmacol Ther* 16:121-130.
74. Groneberg, D. A., W. Heppt, A. Cryer, A. Wussow, C. Peiser, M. Zweng, Q. T. Dinh, C. Witt, and A. Fischer. 2003. Toxic rhinitis-induced changes of human nasal mucosa innervation. *Toxicol Pathol* 31:326-331.
75. Palmer, J. B., and P. J. Barnes. 1987. Neuropeptides and airway smooth muscle function. *Am Rev Respir Dis* 136:S50-S54.
76. Fischer, T. C., P. Hartmann, C. Loser, J. Springer, C. Peiser, Q. T. Dinh, A. Fischer, and D. A. Groneberg. 2001. Abundant expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC2 mRNA in human skin. *J Invest Dermatol*. 117:754-756.
77. Groneberg, D. A., P. Hartmann, Q. T. Dinh, and A. Fischer. 2001. Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC(2) mRNA in human airways. *Lab Invest* 81:749-755.
78. McLatchie, L. M., N. J. Fraser, M. J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M. G. Lee, and S. M. Foord. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333-339.
79. Dunzendorfer, S., C. Meierhofer, and C. J. Wiedermann. 1998. Signaling in neuropeptide-induced migration of human eosinophils. *J Leukoc.Biol* 64:828-834.
80. Levite, M., L. Cahalon, R. Hershkovich, L. Steinman, and O. Lider. 1998. Neuropeptides, via specific receptors, regulate T cell adhesion to fibronectin. *J Immunol* 160:993-1000.
81. Springer, J., S. Amadesi, M. Trevisani, S. Harrison, Q. T. Dinh, G. P. McGregor, A. Fischer, P. Geppetti, and D. A. Groneberg. 2004. Effects of alpha calcitonin gene-related peptide in human bronchial smooth muscle and pulmonary artery. *Regul.Pept.* 118:127-134.
82. Baraniuk, J. N., J. D. Lundgren, M. Okayama, J. Mullol, M. Merida, J. H. Shelhamer, and M. A. Kaliner. 1990. Vasoactive intestinal peptide in human nasal mucosa. *J Clin Invest* 86:825-831.

83. Ghatei, M. A., M. N. Sheppard, D. J. O'Shaughnessy, T. E. Adrian, G. P. McGregor, J. M. Polak, and S. R. Bloom. 1982. Regulatory peptides in the mammalian respiratory tract. *Endocrinology* 111:1248-1254.
84. Vaudry, D., B. J. Gonzalez, M. Basille, L. Yon, A. Fournier, and H. Vaudry. 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269-324.
85. Groneberg, D. A., K. F. Rabe, and A. Fischer. 2006. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol* 533:182-194.
86. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, A. Fernandez-Martin, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 107:3632-3638.
87. Ganea, D., and M. Delgado. 2001. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 49:101-110.
88. Palmer, J. B., F. M. Cuss, J. B. Warren, M. Blank, S. R. Bloom, and P. J. Barnes. 1986. Effect of infused vasoactive intestinal peptide on airway function in normal subjects. *Thorax* 41:663-666.
89. Barnes, P. J., and C. M. Dixon. 1984. The effect of inhaled vasoactive intestinal peptide on bronchial reactivity to histamine in humans. *Am Rev Respir Dis* 130:162-166.
90. Goetzl, E. J., S. P. Sreedharan, C. W. Turck, R. Bridenbaugh, and B. Malfroy. 1989. Preferential cleavage of amino- and carboxyl-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11). *Biochem Biophys Res Commun.* 158:850-854.
91. Caughey, G. H. 1989. Roles of mast cell tryptase and chymase in airway function. *Am J Physiol* 257:L39-L46.
92. Hajos, F., B. Stark, S. Hensler, R. Prassl, and W. Mosgoeller. 2008. Inhalable liposomal formulation for vasoactive intestinal peptide. *Int J Pharm.*
93. Linden, A., L. Hansson, A. Andersson, M. Palmqvist, P. Arvidsson, C. G. Lofdahl, P. Larsson, and J. Lotvall. 2003. Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma. *Thorax* 58:217-221.
94. Delgado, M., R. P. Gomariz, C. Martinez, C. Abad, and J. Leceta. 2000. Anti-inflammatory properties of the type 1 and type 2 vasoactive intestinal peptide receptors: role in lethal endotoxic shock. *Eur J Immunol* 30:3236-3246.
95. Lerner, E. A., J. M. Ribeiro, R. J. Nelson, and M. R. Lerner. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J Biol Chem* 266:11234-11236.

96. Uchida, D., I. Tatsuno, T. Tanaka, A. Hirai, Y. Saito, O. Moro, and M. Tajima. 1998. Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor. *Ann N Y Acad Sci* 865:253-258.
97. Guilpin, V. O., C. Swardson-Oliver, L. Nosbisch, and R. G. Titus. 2002. Maxadilan, the vasodilator/immunomodulator from *Lutzomyia longipalpis* sand fly saliva, stimulates haematopoiesis in mice. *Parasite Immunol* 24:437-446.
98. Bozza, M., M. B. Soares, P. T. Bozza, A. R. Satoskar, T. G. Diacovo, F. Brombacher, R. G. Titus, C. B. Shoemaker, and J. R. David. 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol* 28:3120-3127.
99. Raabe, O. G., M. A. Al-Bayati, S. V. Teague, and A. Rasolt. 1988. Regional Deposition of Inhaled Monodisperse Coarse and Fine Aerosol Particles in Small Laboratory Animals. *Annals of Occupational Hygiene* 32:53-63.
100. Glaab, T., A. Daser, A. Braun, U. Neuhaus-Steinmetz, H. Fabel, Y. Alarie, and H. Renz. 2001. Tidal midexpiratory flow as a measure of airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L565-L573.
101. Fuller, R. W., C. M. Dixon, and P. J. Barnes. 1985. Bronchoconstrictor response to inhaled capsaicin in humans. *J Appl Physiol* 58:1080-1084.
102. Nassenstein, C., T. Kammertoens, T. Z. Veres, W. Uckert, E. Spies, B. Fuchs, N. Krug, and A. Braun. 2007. Neuroimmune crosstalk in asthma: dual role of the neurotrophin receptor p75NTR. *J Allergy Clin Immunol* 120:1089-1096.
103. Groneberg, D. A., K. F. Rabe, U. Wagner, and A. Fischer. 2004. [Vasoactive intestinal polypeptide in the respiratory tract: physiology and pathophysiology]. *Pneumologie* 58:330-338.
104. Liu, L., J. H. Yen, and D. Ganea. 2007. A novel VIP signaling pathway in T cells cAMP-->protein tyrosine phosphatase (SHP-2?)-->JAK2/STAT4-->Th1 differentiation. *Peptides* 28:1814-1824.
105. Pozo, D., P. Anderson, and E. Gonzalez-Rey. 2009. Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *J Immunol* 183:4346-4359.
106. Delgado, M., and D. Ganea. 2001. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Arch Physiol Biochem* 109:377-382.
107. Delgado, M., and D. Ganea. 2003. Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-8 production in human monocytes by downregulating nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 302:275-283.
108. Delgado, M., A. Reduta, V. Sharma, and D. Ganea. 2004. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *J Leukoc Biol* 75:1122-1130.

109. Wheat, W. H., K. E. Pauken, R. V. Morris, and R. G. Titus. 2008. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol* 180:8286-8298.
110. Weigt, H., C. Nassenstein, T. Tschernig, P. F. Muhlradt, N. Krug, and A. Braun. 2005. Efficacy of macrophage-activating lipopeptide-2 combined with interferon-gamma in a murine asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 172:566-572.
111. Nassenstein, C., D. Dawbarn, K. Pollock, S. J. Allen, V. J. Erpenbeck, E. Spies, N. Krug, and A. Braun. 2006. Pulmonary distribution, regulation, and functional role of Trk receptors in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118:597-605.
112. Tumes, D. J., J. Cormie, M. G. Calvert, K. Stewart, C. Nassenstein, A. Braun, P. S. Foster, and L. A. Dent. 2007. Strain-dependent resistance to allergen-induced lung pathophysiology in mice correlates with rate of apoptosis of lung-derived eosinophils. *J Leukoc Biol* 81:1362-1373.
113. Martinez, C., C. Abad, M. Delgado, A. Arranz, M. G. Juarranz, N. Rodriguez-Henche, P. Brabet, J. Leceta, and R. P. Gomariz. 2002. Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A* 99:1053-1058.
114. Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
115. Abad, C., C. Martinez, M. G. Juarranz, A. Arranz, J. Leceta, M. Delgado, and R. P. Gomariz. 2003. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961-971.
116. Tang, Y., B. Lv, H. Wang, X. Xiao, and X. Zuo. 2008. PACAP inhibit the release and cytokine activity of HMGB1 and improve the survival during lethal endotoxemia. *Int Immunopharmacol* 8:1646-1651.
117. Azuma, Y. T., K. Hagi, N. Shintani, M. Kuwamura, H. Nakajima, H. Hashimoto, A. Baba, and T. Takeuchi. 2008. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. *J Cell Physiol* 216:111-119.
118. Nemetz, N., C. Abad, G. Lawson, H. Nobuta, S. Chhith, L. Duong, G. Tse, J. Braun, and J. A. Waschek. 2008. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. *Int J Cancer* 122:1803-1809.
119. Kay, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl.J Med* 344:30-37.
120. Favit, A., U. Scapagnini, and P. L. Canonico. 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates different signal transducing mechanisms in cultured cerebellar granule cells. *Neuroendocrinology* 61:377-382.

121. Gonzalez, B. J., P. Leroux, M. Basille, C. Bodenant, and H. Vaudry. 1994. Somatostatin and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP): two neuropeptides potentially involved in the development of the rat cerebellum. *Ann Endocrinol (Paris)* 55:243-247.
122. Villalba, M., J. Bockaert, and L. Journot. 1997. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83-90.
123. Dickson, L., and K. Finlayson. 2009. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther* 121:294-316.
124. McCulloch, D. A., E. M. Lutz, M. S. Johnson, D. N. Robertson, C. J. MacKenzie, P. J. Holland, and R. Mitchell. 2001. ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC(1) receptor splice variant. *Mol Pharmacol* 59:1523-1532.
125. Bodart, V., K. Babinski, H. Ong, and A. De Lean. 1997. Comparative effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on aldosterone secretion in normal bovine and human tumorous adrenal cells. *Endocrinology* 138:566-573.
126. Michalski, C. W., F. Selvaggi, M. Bartel, T. Mitkus, A. Gorbachevski, T. Giese, P. D. Sebastiano, N. A. Giese, and H. Friess. 2008. Altered anti-inflammatory response of mononuclear cells to neuropeptide PACAP is associated with deregulation of NF- κ B in chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G50-57.
127. Ding, W., J. A. Wagner, and R. D. Granstein. 2007. CGRP, PACAP, and VIP modulate Langerhans cell function by inhibiting NF-kappaB activation. *J Invest Dermatol* 127:2357-2367.
128. Delgado, M., and D. Ganea. 2001. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit expression of Fas ligand in activated T lymphocytes by regulating c-Myc, NF-kappa B, NF-AT, and early growth factors 2/3. *J Immunol* 166:1028-1040.
129. Gourlet, P., A. Vandermeers, P. Vertongen, J. Rathe, P. De Neef, J. Cnudde, M. Waelbroeck, and P. Robberecht. 1997. Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* 18:1539-1545.
130. Bolin, D. R., J. Michalewsky, M. A. Wasserman, and M. O'Donnell. 1995. Design and development of a vasoactive intestinal peptide analog as a novel therapeutic for bronchial asthma. *Biopolymers* 37:57-66.
131. Tsutsumi, M., T. H. Claus, Y. Liang, Y. Li, L. Yang, J. Zhu, F. Dela Cruz, X. Peng, H. Chen, S. L. Yung, S. Hamren, J. N. Livingston, and C. Q. Pan. 2002. A potent and highly selective VPAC2 agonist enhances glucose-induced insulin release and glucose disposal: a potential therapy for type 2 diabetes. *Diabetes* 51:1453-1460.

132. Cui, Z. H., A. Joetham, M. K. Aydintug, Y. S. Hahn, W. K. Born, and E. W. Gelfand. 2003. Reversal of allergic airway hyperreactivity after long-term allergen challenge depends on gammadelta T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1324-1332.
133. Jutel, M., M. Akdis, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2006. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy* 61:796-807.
134. Eisenbarth, S. C., A. Zhadkevich, P. Ranney, C. A. Herrick, and K. Bottomly. 2004. IL-4-dependent Th2 collateral priming to inhaled antigens independent of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88. *J Immunol* 172:4527-4534.
135. Yu, R., T. Yi, S. Xie, and A. Hong. 2008. Long-term administration of maxadilan improves glucose tolerance and insulin sensitivity in mice. *Peptides* 29:1347-1353.
136. Quaedylieg, V., J. Sele, M. Henket, and R. Louis. 2009. Association between asthma control and bronchial hyperresponsiveness and airways inflammation: a cross-sectional study in daily practice. *Clin Exp Allergy*.
137. Sheller, J. R., V. V. Polosukhin, D. Mitchell, D. S. Cheng, R. S. Peebles, and T. S. Blackwell. 2009. Nuclear factor kappa B induction in airway epithelium increases lung inflammation in allergen-challenged mice. *Exp Lung Res* 35:883-895.
138. Szema, A. M., S. A. Hamidi, S. Lyubsky, K. G. Dickman, S. Mathew, T. Abdel-Razek, J. J. Chen, J. A. Waschek, and S. I. Said. 2006. Mice lacking the VIP gene show airway hyperresponsiveness and airway inflammation, partially reversible by VIP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L880-L886.
139. Chu, A., J. S. Caldwell, and Y. A. Chen. 2009. Identification and Characterization of a Small Molecule Antagonist of Human VPAC2 Receptor. *Mol Pharmacol*.

A2 Abkürzungsverzeichnis

AHR	Atemwegshyperreagibilität
AP-1	Activated protein 1
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
B ₂	Bradykininrezeptor 2
BALF	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i> (Bronchoalveolare Spülflüssigkeit)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Bovines Serumalbumin)
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i> (Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i> (Calcitonin Gen verwandtes Protein)
DC	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DEX	Dexamethason behandelte Gruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ED50	Effektive Dosis 50
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunabsorbtionstest)
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i> (Intrazelluläres Adhäsionsmolekül)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B- α	<i>Inhibitor of nuclear factor κ B-α</i> (Inhibitor von Kernfaktor κ B- α)
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intratracheal
LPS	Lipopolysaccharid
M65neg	M65 behandelte nicht sensibilisierte Gruppe
M65pos	M65 behandelte sensibilisierte Gruppe

MACS	<i>Magnetic cell separation</i> (Magnetische Zellaufreinigung)
MAP	Mitogen aktiviertes Protein
MAXneg	Maxadilan behandelte nicht sensibilisierte Gruppe
MAXpos	Maxadilan behandelte sensibilisierte Gruppe
MBP	<i>Major basic protein</i> (Basisches Hauptprotein)
MCh	Acetyl- β -methylcholinchlorid
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitats Komplex)
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (Inflammatorisches Makrophagen Protein)
MKP	<i>Mitogen activated protein kinase phosphatase</i> (Mitogen aktivierte Proteinkinase-Phosphatase)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NEG	Negativkontrollgruppe
NEP	Neutrophile Endopeptidase
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i> (Kernfaktor aktivierter T-Zellen)
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Kernfaktor Kappa B)
NK1	Neurokininrezeptor 1
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
OCT	<i>Optimal cutting temperature compound</i> (Einbettmedium fur Gefrierschnitte)
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAC1	<i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor 1</i> (Hypophysen Adenylatzyklase aktivierendes Peptid-Rezeptor 1)
PACAP	<i>Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i> (Hypophysen Adenylatzyklase aktivierendes Polypeptid)
PAF	<i>Platelet activating factor</i> (Thrombozyten aktivierender Faktor)
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Saline)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
POS	Positivkontrollgruppe

RAMP	<i>Receptor activity modifying proteins</i> (Rezeptoraktivität modifizierendes Protein)
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SIT	<i>Specific immune treatment</i> (spezifische Immuntherapie)
SP	Substanz P
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> (Signaltransduktoren und Aktivatoren für Transkription)
TB	<i>Time of breaking</i> (Pause zwischen Inspiration und Expiration)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i> (Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül)
VIP	<i>Vasoactive intestinal polypeptide</i> (Vasoaktives intestinales Polypeptid)
VPAC	<i>Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor</i> (Vasoaktives intestinales Peptid und Hypophysen Adenylatzyklase aktivierendes Polypeptid Rezeptor)

A3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Übersicht über immunologische und neurologische Vorgänge in der asthmatischen Lunge	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des akuten Asthmaprotokolls	27
Abbildung 3: Schematische Darstellung des chronischen Asthmaprotokolls	28
Abbildung 4: Prozentuale Darstellung der BALF Zelldifferenzierung für die Maxadilan Dosisfindung	30
Abbildung 5: Prozentuale Darstellung der BALF Zelldifferenzierung für die Maxadilan Dosisfindung	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Head-Out-Body-Plethysmograph Messplatzes	33
Abbildung 7: Expression der VIP/PACAP Rezeptoren normalisiert auf PBGD	51
Abbildung 8: Gelbilder der PBGD und PAC1 PCR Ansätze für DC, T-Zellen und Makrophagen	52
Abbildung 9: Plasma IgE Konzentrationen akutes Modell	54
Abbildung 10: Zellzahlen der BALF akutes Modell	55
Abbildung 11: Repräsentative Bilder von Azan gefärbten Lungengewebschnitten akutes Modell	56
Abbildung 12: BALF Zytokine akutes Modell	57
Abbildung 13: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen akutes Modell	58
Abbildung 14: Plasma IgE Konzentrationen chronisches Modell	60
Abbildung 15: Gesamtzellzahlen der BALF zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	61
Abbildung 16: Zellzahlen der BALF zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	62
Abbildung 17: Masson-Goldner Färbung Paraffin fixierter Lungenschnitte zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	63
Abbildung 18: Fluoreszenzfärbung von Lungenschnitten zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	66
Abbildung 19: BALF Zytokine zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	69
Abbildung 20: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen zum akuten Aufarbeitungszeitpunkt chronisches Modell	70
	109

Abbildung 21: Verlaufsgraphen der Gesamtzellzahlen der BALF	71
Abbildung 22: Gesamtzellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten chronisches Modell	72
Abbildung 23: Verlaufsgraphen der neutrophilen Granulozyten Zellzahlen der BALF chronisches Modell	74
Abbildung 24: Neutrophile Granulozyten Zellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten chronisches Modell	75
Abbildung 25: Verlaufsgraphen der eosinophilen Granulozyten Zellzahlen der BALF chronisches Modell	76
Abbildung 26: Eosinophile Granulozyten Zellzahlen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten chronisches Modell	77
Abbildung 27: Verlaufsgraphen der Eotaxin-2 Konzentrationen der BALF chronisches Modell	81
Abbildung 28: Eotaxin-2 Konzentrationen der BALF zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten chronisches Modell	82
Abbildung 29: Plasma Verdünnungen im Maxadilan (A) und M65 (B) Bioassay zur Detektion Maxadilan und M65 spezifischen IgG1	84
Abbildung 30: Ergebnisse Bioassay zur Detektion Maxadilan und M65 spezifischen IgG1	85
Abbildung 31: Schematische Darstellung der Induktion einer Th2 gerichteten Immunreaktion und deren Hemmung durch Maxadilan	90

A4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlungen der akuten Maxadilan-Studie	25
Tabelle 2: Übersicht über die Gruppeneinteilung und Behandlungen der chronischen Maxadilan-Studie	25
Tabelle 3: Makrophagen Zellzahlen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten	73
Tabelle 4: Lymphozyten Zellzahlen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten	78
Tabelle 5: IL-4 Konzentrationen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten	79
Tabelle 6: IL-5 Konzentrationen der BALF aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten	80
Tabelle 7: Ergebnisse der Lungenfunktionsmessungen aller Gruppen zu den verschiedenen Aufarbeitungszeitpunkten	83

A5 Veröffentlichungen

Publikationen in Peer-Reviewed-Journals

1. “Pituitary adenylate cyclase activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice”
Lauenstein HD, Quarcoo D, Pilzner C, Plappert L, Schleh C, Nassimi M, Rochlitzer S, Brabet P, Welte T, Hoymann HG, Krug N, Müller M, Lerner EA, Braun A, Groneberg DA
 [Eingereicht]
2. “Expression of VPAC1 in a Model of Environmental Allergic Asthma”
Lauenstein HD, Pilzner C, Schleh C, Nassimi M, Golpon H, Fischer A, Krug N, Welte T, Braun A, Quarcoo D, Groneberg DA.
 [In Revision]
3. “Allergen particle binding and Interleukin-8 secretion by human primary bronchial epithelial cells is modulated by surfactant protein D”
 Schleh C, Erpenbeck VJ, **Lauenstein HD**, Nassimi M, Braun A, Krug N, Hohlfeld JM.
 [In Revision]
4. “A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a drug delivery system for the lung”
 Nassimi M , Schleh C, **Lauenstein HD**, Hussein R, Koch W, Pohlmann G, Krug N, Sewald K, Rittinghausen S, Müller-Goymann CC, Braun A.
 [Akzeptiert]
5. “A Toll-like receptor 2/6-agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitisation to Timothy grass pollen allergens”
 Fuchs B, Knothe S, Rochlitzer S, Nassimi M , Greweling M, **Lauenstein HD**, Nassenstein C, Müller M, Ebensen T, Dittrich AM, Krug N, Guzman CA, Braun A.
 Int Arch All Immunol. 2009 Dec 16; 152(2):131-139

6. “The effect of titanium dioxide nanoparticles on pulmonary surfactant function and ultrastructure”
Schleh C, Mühlfeld C, Pulskamp K, Schmiedl A, Nassimi M, **Lauenstein HD**, Braun A, Krug N, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM.
Respir Res. 2009 Sep 30;10:90.
7. “Low cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in in vitro and ex vivo lung models”
Nassimi M, Schleh C, **Lauenstein HD**, Hussein R, Lübbers K, Pohlmann G, Switalla S, Sewald K, Müller M, Krug N, Müller-Goymann CC, Braun A.
Inhal Toxicol. 2009 Jul; Volume 21 Suppl 1:104-9.
8. “Expression, localisation and functional implications of the transporter protein PEPT2 in the upper respiratory tract”
Quarcoo D, Fischer TC, Heppt W, **Lauenstein HD**, Pilzner C, Welte T, Groneberg DA.
Respiration. 2009;77(4):440-6. Epub 2008 Dec 2.
9. “Pan-neurotrophin receptor p75NTR expression is strongly induced in lesional atopic mast cells”
Fischer TC, **Lauenstein HD**, Serowka F, Pilzner C, Groneberg DA, Welker P.
Clin Exp Allergy. 2008 Jul;38(7):1168-73. Epub 2008 May 8.

Beiträge auf Kongressen

1. EAACI Winterschool, Davos, Schweiz (01.02-04.02.2007)
 “Function of pituitary adenylate cyclase activating peptide receptor 1 in a murine model of allergic asthma” (Poster)
Lauenstein HD, Quarcoo D, Fuchs B, Nassenstein C, Plappert L, Hamelmann E, Fischer F, Krug N, Welte T, Braun A, Groneberg DA.

2. ATS Jahreskongress 2007, San Francisco, USA (18.05-23.05.2007)
 “Function of G-protein-coupled receptors of the VIP family in the pathogenesis of allergic asthma” (Poster)
Lauenstein HD, Quarcoo D, Fuchs B, Nassenstein C, Plappert L, Hamelmann E, Fischer A, Krug N, Welte T, Braun A, Groneberg DA.

3. 8th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Manchester VT, USA (03.09-08.09.2007)
 “Function of pituitary adenylate cyclase activating peptide receptor 1 in a murine model of allergic asthma” (Mündlicher Vortrag)
Lauenstein HD, Quarcoo D, Fuchs B, Plappert L, Fischer A, Krug N, Welte T, Braun A, Groneberg DA.
 J Mol Neurosci. 2007; 33 (7):324-5.

4. EAACI Jahreskongress, Barcelona, Spanien (07.06-11.06.2008)
 “Effects of specific pituitary adenylate cyclase activating peptide receptor 1 agonist maxadilan in a murine model of allergic asthma” (Poster)
Lauenstein HD, Quarcoo D, Plappert L, Fischer A, Krug N, Welte T, Braun A, Groneberg DA.
 Allergy. 2008; 63: 557.

5. EAACI Jahreskongress Warschau, Polen (06.06-10.06.2009)
 “Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide Receptor 1 in a murine model of asthma” (Mündlicher Vortrag, Poster)
Lauenstein HD, Plappert L, Rochlitzer S, Pilzner C, Krug N, Welte T, Groneberg DA, Braun A.
 Allergy. 2009; 64: 89.

A6 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Hans-Dieter Lauenstein
 Geburtsdatum: 29.08.1977
 Geburtsort: Hamburg

Schulbildung

08/1984- 07/1988: Grundschule Schnuckendrift, Hamburg
 08/1988- 07/1998: Gymnasium Süderelbe, Hamburg
 Abschluss: Abitur

Wehrdienst

09/1998- 03/1999: Wehrdienst im Sanitätsdienst in Breitenburg/Nordoe

Berufserfahrung

04/1999- 03/2000: Krankenpflegepraktikum / Krankenpflegehelfer
 Krankenhaus Mariahilf, Hamburg

Wissenschaftlicher Werdegang

04/2000- 03/2001: Studium der Biologie und Geographie, Höheres Lehramt
 Universität Hamburg
 04/2001- 04/2006: Studium der Biologie, Abschluss: Vordiplom
 Universitäten Hamburg und Hannover
 Abschluss: Diplom Biologe
 Seit 04/2006: Wissenschaftlicher Mitarbeiter
 Fraunhofer ITEM und Medizinische Hochschule Hannover

Preise und Stipendien

- 09/2007 Reiestipendium für “8th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides”, Manchester, VT, USA, 2007, gestiftet durch die Organisatoren
- 09/2007 Reiestipendium für “8th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides”, Manchester, VT, USA, 2007, gestiftet durch die Glaxo-Smith-Kline Stiftung
- 06/2008 Posterpreis EAACI Jahreskongress 2008, Barcelona, Spanien
Session: Asthma Pharmacology-from Expected Models to Biologicals
- 06/2009 Posterpreis EAACI Jahreskongress 2009, Warschau, Polen
Session: 11th JMA Poster Session

A7 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich in diesem Projekt auf so vielfältige Weise unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. David Groneberg für die Bereitstellung des Themas. Er war stets offen für meine Ideen und unterstützte mich tatkräftig bei meiner Arbeit. Die intensiven Diskussionen und freundschaftlichen Gespräche waren mir eine große Hilfe.

Herrn PD Dr. Armin Braun danke ich ganz besonders für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Fraunhofer ITEM anzufertigen. Seine effiziente Betreuung und sein offenes Ohr für jede Art von Problemen, sowie seine Geduld in schwierigen Situationen haben wesentlich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen.

Prof. Dr. Analet Ngezahayo möchte ich für die Übernahme der externen Betreuung und der Unterstützung als mein Doktorvater danken.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Huchzermeyer danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. Meike Müller möchte ich für Geduld danken, mit der Sie sich den Problemen und Fragen aller Doktoranden in der Gruppe annimmt, sowie die fachkundige und konkrete Hilfe die sie stets jedem Problemfall zukommen lässt.

Herrn Prof. Dr. Ethan Lerner möchte ich für die großzügige Bereitstellung der Testsubstanzen Maxadilan und M65 danken.

Meiner Kollegin Linda Plappert möchte ich ganz herzlich für die hervorragende praktische Zusammenarbeit, für diverse Korrekturen der meisten schriftlichen Arbeiten und ihre liebe Art danken. Schön, dass wir so viel Spaß zusammen hatten.

Den Mitgliedern des Lift-Clubs Hannover möchte nicht nur für die nachmittäglichen Treffen danken, sondern auch für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung. Die großteils erstaunlich hochwertigen Diskussionen fehlen mir jetzt schon.

Frau Saskia Knothe danke ich insbesondere für die ausführlichen Korrekturen an der Dissertation und an vielen anderen Texten.

Meinen Kollegen Olaf Macke und Sabine Schild möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung danken. Wann immer Not am Mann war konnte ich auf sie zählen.

Allen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Immunologie, Allergologie und Immuntoxikologie danke ich für die tolle Zusammenarbeit. In dieser Arbeitsgruppe habe ich mich sehr wohl und gut aufgehoben gefühlt.

Ich danke meinen Eltern Dieter und Barbara, meinen Geschwistern Anke und Silke und meinem Schwager Frank, die mich ebenfalls in jeder denkbaren Art unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Lan, die mir insbesondere gegen Ende der Doktorarbeit trotz der Geburt unserer Tochter Lisa genug Freiraum geschaffen hat, um diese Dissertation fertigzustellen. Du bist immer da, wenn ich Dich brauche.

Euch allen vielen lieben Dank!

A8 Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation

„Agonisierung des PAC1-Rezeptors vermittelt antiinflammatorische Effekte in murinen Modellen für allergisches Asthma“

selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, 16.12.2009

Hans-Dieter Lauenstein