

**Peptiderge Mediatoren und ihr Beitrag
zur Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen**

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

Experimentelle Pneumologie und Allergologie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Dr. med. Jan David Alexander Groneberg

geboren am 11. Dezember 1973 in Frankfurt am Main

Dekane: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

eingereicht: September 2003

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 18. März 2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Gerhard Schultze-Werninghaus

2. Prof. Dr. med. Tobias Welte

Für Beatrix

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Historischer Rückblick	1
1.2	Neurogene Entzündung	4
1.3	Peptiderge Mediatoren.....	6
1.3.1	Pro-inflammatorische peptiderge Mediatoren.....	6
1.3.2	Anti-inflammatorische peptiderge Mediatoren	8
1.3.3	Vasoaktives Intestinales Polypeptid	9
1.3.3.1	Struktur und Lokalisation.....	9
1.3.3.2	Rezeptoren	13
1.3.3.3	Biologische Funktionen	16
1.4	Fragestellung und Ziel.....	23
2	Atemwege	25
2.1	Molekularbiologische Darstellung von VIP- Rezeptoren	25
2.2	Änderungen unter pathophysiologischen Bedingungen	28
2.2.1	Toxische Rhinitis.....	29
2.2.2	Hyperreflektorische Rhinitis	31
2.2.3	Aspirin-sensitive Rhinitis	33
2.2.4	Identifizierung eines Hypoxie-regulierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors	37
3	Haut.....	40
3.1	Mediatorprofil in der Haut unter normalen Bedingungen	41
3.2	Funktionelle Regulation von VIP-Rezeptoren bei atopischer Dermatitis	

4	Signaltransduktionsmechanismen	47
4.1	Expression von „Immediate Early Genes“ in sensiblen Ganglien	47
4.2	Expression von c-Jun in sympathischen Ganglien des Meerschweinchens unter normalen Bedingungen und allergischer Atemwegsentzündung	48
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54

**Veröffentlichungen zum Thema der vorliegenden
kumulativen Habilitationsschrift**

1 D. A. Groneberg, P. Hartmann, Q. T. Dinh, A. Fischer. Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human airways. *Lab. Invest.* 81: 749-755 (2001).

2 D. A. Groneberg, W. Heppt, A. Cryer, A. Wussow, C. Peiser, M. Zweng, Q. T. Dinh, C. Witt, A. Fischer. Toxic rhinitis-induced changes of human nasal mucosa innervation. *Toxicol. Pathol.* 31(3): 326-331 (2003)

3 W. Heppt, C. Peiser, A. Cryer, Q. T. Dinh, M. Zweng, C. Witt, A. Fischer, D. A. Groneberg. Innervation of human nasal mucosa in environmentally triggered hyperreflexic rhinitis. *J. Occup. Environ. Med.* 44(10): 924-929 (2002).

4 D. A. Groneberg, W. Heppt, P. Welker, C. Peiser, Q. T. Dinh, A. Cryer, M. Zweng, C. Witt., A. Fischer. Aspirin-sensitive rhinitis associated changes in upper airway innervation. *Eur. Respir. J.* Im Druck (2003).

5 J. Hänze, D. A. Groneberg, F. Rose, A. Hanisch, J. Dötsch, C. Peiser, W. Seeger, W. Rascher, A. Fischer, F. Grimminger. Genomic organization and regulation of a human 7-helix transmembrane receptor which is expressed in

pulmonary epithelial cells and induced in hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:1160-1165 (2002).

6 T. C. Fischer, P. Hartmann, C. Löser, J. Springer, C. Peiser, Q. T. Dinh, A. Fischer, D. A. Groneberg. Abundant expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117(3): 754-756 (2001).

7 D. A. Groneberg, P. Welker, T. C. Fischer, Q. T. Dinh, A. Grützkau, C. Peiser, U. Wahn, B. M. Henz, A. Fischer. Downregulation of vasoactive intestinal polypeptide receptor expression in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(5):1099-1105 (2003).

8 D. A. Groneberg, S. Wiegand, Q. T. Dinh, C. Peiser, J. Springer, and A. Fischer. Expression of immediate early genes in sensory ganglia. *Neurochem. Res.* 26(10):1113-1117 (2001).

9 D. A. Groneberg, S. Wiegand, Q. T. Dinh, C. Peiser, A. Fischer. High basal expression of c-jun in guinea pig sympathetic ganglia neurons. *Lung* 180(4):221-228 (2002)

Abkürzungsverzeichnis

AD	atopische Dermatitis
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
GRF	Growth hormone-releasing factor
HRE	Hypoxia responsive elements
kb	Kilobasenpaare
NANC	nicht-adrenerges nicht-cholinerges System
NEP	Neutrale Endopeptidase
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
NPK	Neuropeptid K
NPY	Neuropeptid Tyrosin
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
PHM/PHI	Peptide having carboxy-terminal methionine/isoleucine
PHV	Peptide histidine valine
PMA	Phorbol-Myristat-Azetat
PPT	Präprotachykinin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

SP	Substanz P
VIP	Vasoaktives Intestinales Polypeptid
VPAC1	VIP/PACAP Typ I-Rezeptor
VPAC2	VIP/PACAP Typ II-Rezeptor

Alle nicht aufgeführten Einheiten sind SI- bzw. erweiterte SI-Einheiten. Die letzte Stelle aller angegebenen Werte ist gerundet. Die Nukleoside werden mit den bekannten 1-Buchstaben-Abkürzungen und die Aminosäuren mit den 3-Buchstaben- bzw. 1-Buchstaben-Abkürzungen abgekürzt.

1 Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

In unserer Umwelt befinden sich zahlreiche chemische und physikalische Noxen, die neben mikrobiellen Erregern dem Körper unterschiedlich starke Schädigungen durch akute oder chronische Einwirkungen zufügen können. Bei dem Kontakt zwischen dem Organismus und seiner Umwelt spielen dabei neben der Haut die Atemwege aufgrund ihrer großen Oberfläche eine bedeutende Rolle. Zum Schutz vor exogenen Noxen hat die Natur im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Abwehrmechanismen entwickelt, die zur Erkennung und Beseitigung schädlicher Einflüsse notwendig sind. Das Spektrum dieser Abwehrmechanismen ist bei höher entwickelten Organismen wie dem Menschen sehr komplex und lässt sich in verschiedene, zusammenwirkende Systeme wie die angeborene und adaptive, erworbene Abwehr einteilen. In ihrer Gesamtheit führen diese durch viele Überschneidungen gekennzeichneten integrativen Systeme des körpereigenen Immunsystems zu einer zielgerichteten Abwehrreaktion gegenüber äußeren Noxen, die zu den Merkmalen einer Entzündungsreaktion führt.

Bereits in der Antike wurden durch Celsius (30 vor bis 38 nach Christus) und Galen (130 bis 201 n. Chr.) die vier heute noch gültigen Kardinalsymptome der Entzündung, „*Tumor*“, „*Rubor*“, „*Calor*“ und „*Dolor*“ beschrieben, welche Rudolf Virchow im Jahr 1858 noch durch das fünfte Symptom, „*Functio laesa*“ ergänzte. Diese fünf klinischen Symptome spiegeln in ihrer Gesamtheit die akute Entzündungsreaktion wider, welche zusammen mit den Formen der chronischen Entzündung im vergangenen Jahrhundert auf der

pathophysiologischen und pathobiochemischen Ebene durch eine Vielzahl von Studien genauer charakterisiert werden konnte. Letztlich sind der Sitz des Entzündungsreizes und die Art der auslösenden Noxe bestimmend, welcher Abwehrmechanismus zur Wirkung kommen wird. Dabei wird die Regulation der Immunantwort durch zelluläre, humorale und auch nervale Einflüsse gesteuert. Stellt die Entzündung primär einen lebenserhaltenden Abwehrmechanismus dar, ohne den der Organismus seine Individualität gegenüber Fremdorganismen verlieren würde, so gibt es auf der anderen Seite auch überschießende Entzündungsreaktionen, welche einen schädigenden Einfluss haben. Wird in dieser Hinsicht körpereigenes Gewebe durch eine inadäquate Antwort des Immunsystems gegenüber exogenen Noxen geschädigt, so spricht man von einer Überempfindlichkeit oder Allergie, wobei die sozioökonomisch bedeutendsten Formen der Allergie das allergische Asthma bronchiale, die atopische Dermatitis, sowie die Rhinokonjunktivitis sind.

Im Gegensatz zu der großen Anzahl an Studien, die eine wesentliche Bedeutung zellulärer und humoraler Bestandteile des Immunsystems bei der Entstehung und Progression allergischer Erkrankungen nachweisen konnten, wurde die Bedeutung des Nervensystems und seiner Mediatoren diesbezüglich in den letzten Jahrhunderten sehr unterschiedlich gewichtet.

Diese wechselnde Bedeutung lässt sich am Beispiel des Asthma bronchiale darlegen: Schon früh nach den ersten detaillierten anatomischen Beschreibungen des Nervensystems der menschlichen Lunge durch Vesalius (1543) wurde die funktionelle Bedeutung der pulmonalen Innervation bezüglich der Pathophysiologie des Asthma bronchiale diskutiert (Willis, 1681). Gestützt

wurde diese Theorie ebenfalls durch Konzepte von Ärzten und Wissenschaftlern wie Johann Juncker (1718), René Théophile Hyacinthe Laennec (1826) und Henry Hyde Salter (1860), die im Wesentlichen auf klinischen Beobachtungen beruhten.

Demgegenüber leiteten ebenfalls klinische Beobachtungen zur Abhängigkeit asthmatischer Symptome von Pollen [Blackley, 1873] die Epoche der immunologischen Ursachenforschung ein. Diese führte zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts mit der Entdeckung der „Anaphylaxie“ durch Portier und Richet (1902) sowie durch von Pirquet (1907) zur Gründung der modernen Allergologie und damit zur weitgehenden Verdrängung von Theorien zu nervalen Einflüssen.

Die geringe Beachtung nervaler Komponenten bei der Entstehung und Fortführung allergischer Erkrankungen wurde erst in den achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts mit der durch Peter J. Barnes (1986) aufgestellten Hypothese beendet, dass Asthma möglicherweise als ein Axonreflex zu verstehen sei. Im Gegensatz zur Allergologie wiesen andere Forschungsgebiete schon weitaus früher auf die Rolle des autonomen Nervensystems und die von ihm freigesetzten Mediatoren bei entzündlichen Erkrankungen hin. In dieser Hinsicht zeigte Bayliss schon 1901, dass die Aktivierung von Spinalganglienneuronen nicht nur afferente, sondern auch efferente Effekte hat [Bayliss, 1901].

Eine Vielzahl an Studien konnten in den Folgejahren zeigen, dass die Aktivierung peripherer afferenter Nervenendigungen zu einer lokalen Freisetzung verschiedener Mediatoren führen kann, deren periphere Wirkung

ganz erheblich in der Pathophysiologie und Pathobiochemie vieler entzündlicher Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielt. Aufgrund dieser entzündungsregulierenden Wirkung der freigesetzten Mediatoren wurde letztlich der Begriff der „neurogenen Entzündung“ eingeführt [Jancso, et al., 1967].

1.2 Neurogene Entzündung

In Anbetracht der weitreichenden Entwicklungen der neuro-immunologischen Forschung hat sich die Frage, ob Asthma oder auch die als „Neurodermitis“ bezeichnete atopische Dermatitis (AD) primär nervale oder primär immunologische Erkrankungen sind, darin aufgelöst, dass es sich bei diesen allergologischen Erkrankungen um komplexe Krankheitsentitäten handelt, die von bidirektionalen Wechselwirkungen beider Systeme geprägt sind.

Die den entzündlichen Veränderungen zugrunde liegenden Mechanismen werden von einer Vielzahl an Mediatoren beeinflusst. Im Bereich der Pathophysiologie und -biochemie des Asthma bronchiale sind dabei mittlerweile bereits über fünfzig Mediatoren mit Effekten auf verschiedenste pulmonale Funktionen beschrieben worden [Chung and Barnes, 1999]. Fortschritte auf diesem Gebiet wurden vor allem durch die Entwicklung neuer, potenter Inhibitoren gemacht, die entweder die Rezeptoren der Mediatoren blockieren oder sie selbst inhibieren [Eynott, et al., 2002; Eynott, et al., 2003; Gozes, et al., 1995; Joos and Pauwels, 2001]. Der Syntheseort der einzelnen Mediatoren liegt sowohl im Bereich von Entzündungszellen wie Mastzellen, Eosinophile, Basophile, Neutrophile oder T-Lymphozyten, als auch im Bereich

gewebsständiger Zellen wie Epithelzellen, Endothelzellen, Myozyten oder Atemwegsneuronen [Barnes, et al., 1998].

Die als neurogene Entzündung beschriebene Komponente bewirkt durch die lokale Freisetzung peptiderger Mediatoren unter anderem klassische Entzündungsmerkmale wie „Calor“, „Rubor“ und „Dolor“ [Richardson and Vasko, 2002].

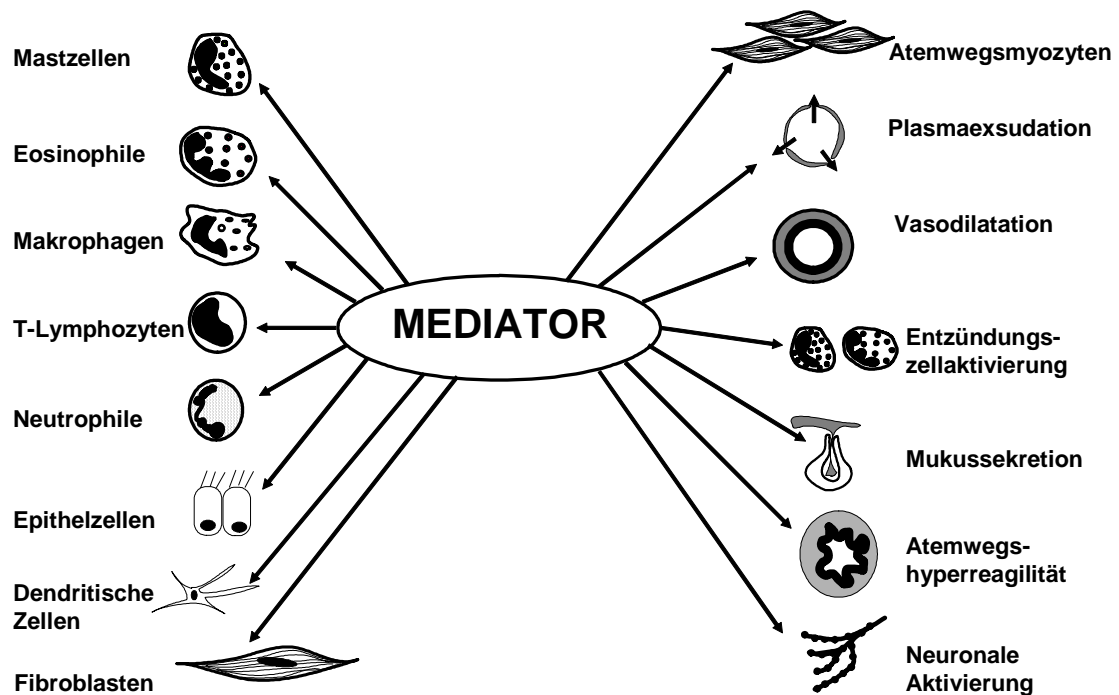


Abbildung 1: Ziele von Entzündungsmediatoren im Atemtrakt

Neben den klassischen Mediatoren Noradrenalin in postganglionären sympathischen und Azetylcholin in parasympathischen Nervenfasern, existiert eine Reihe von peptidergen Mediatoren, die ausgeprägte funktionelle Effekte auf verschiedenste respiratorische Funktionen wie den Muskeltonus der Gefäße und Atemwege, die Drüsensekretion und auf Entzündungs- und Immunzellen haben [van der Velden and Hulsmann, 1999].

Die Neuropeptide gehören zu keinem morphologisch eingrenzbaeren Nervensystem innerhalb der Atemwege, und ihre Effekte wurden deshalb unter dem Begriff des nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC)-System zusammengefasst [Widdicombe, 1998]. Aufgrund physiologischer und pharmakologischer Erkenntnisse wurden die NANC-Mediatoren in die zwei funktionell divergenten Gruppen des exzitatorischen NANC-Systems (e-NANC) und des inhibitorischen NANC-Systems (i-NANC) eingeordnet [Linden, 1996].

1.3 Peptiderge Mediatoren

1.3.1 Pro-inflammatorische peptiderge Mediatoren

Zu den pro-inflammatorischen e-NANC Mediatoren gehören neben Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP) [Springer, et al., 2003] auch die Familie der Tachykinine [Joos, et al., 2000], deren ältester Vertreter der 1931 durch von Euler und Gaddum beschriebene Mediator Substanz P (SP) ist [von Euler and Gaddum, 1931]. Nach der Sequenzierung von Substanz P [Chang, et al., 1971; Tregear, et al., 1971] und weiterer Tachykinine zeigte sich, dass diese Neuropeptide alle durch die C-terminale Aminosäuresequenz Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ (X= variable Aminosäure) gekennzeichnet sind [Maggi, 1996; Maggi,

et al., 1995]. Die Tachykinin-Mediatoren Substanz P, Neurokinin A (NKA), sowie Neuropeptid K (NPK) und Neuropeptid γ werden vom Präprotachykinin A (PPT-A)-Gen kodiert und durch alternatives Splicing vier verschiedener mRNA-Formen gebildet [Nawa, et al., 1984]. Ein weiterer Vertreter der Tachykininfamilie ist das in den Atemwegen bisher nicht nachgewiesene Neurokinin B (NKB), welches durch das PPT-B-Gen kodiert wird [Kotani, et al., 1986; Maggi, et al., 1995].

Substanz P und Neurokinin A werden als Mediatoren von Atemwegsprojizierenden Neuronen freigesetzt und immunhistochemische Studien konnten ihre Expression in Nervenfasern der unteren Atemwege des Menschen und des Meerschweinchens nachweisen, wobei jedes Kompartiment der unteren Atemwege mit Ausnahme der Knorpelspangen von Tachykinin-haltigen Axonen durchzogen wird [Hua, et al., 1985; Lundberg, et al., 1984]. Diese Nervenfasern enthalten neben den Tachykininen zum größten Teil auch das ebenfalls pro-inflammatorische CGRP [Lundberg, et al., 1985]. Kombinierte retrograde neuronale Markierungsstudien und Immunhistochemien konnten die sensiblen Vagusganglien sowie die oberen thorakalen Spinalganglien als die Ursprungsorte Substanz P/ NKA/ CGRP-exprimierender Atemwegsneurone im Meerschweinchen identifizieren [Kummer, et al., 1992].

Die pulmonalen Wirkungen der pro-inflammatorischen Tachykinine wird über verschiedene Tachykinin-Rezeptoren induziert [Canning, et al., 1998; Maggi, 1995], wobei Rezeptoren in den Bereichen von Tracheal- und Bronchialmuskel, Drüsen sowie im respiratorischen Epithel und in Lamina propria-Zellen nachgewiesen werden konnten [Fischer, et al., 1992].

Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der einzelnen Tachykinine zu deren Rezeptoren lassen diese sich pharmakologisch differenzieren. Substanz P vermittelt dabei seine Wirkung bevorzugt über den NK1-Rezeptor, wohingegen Neurokinin A bevorzugt über den NK2-Rezeptor wirkt [Maggi, 1995].

Insgesamt gibt es ein profundes Wissen über die pro-inflammatorische Wirkung der Tachykinin-Mediatoren im Rahmen der Pathophysiologie und Pathobiochemie einer Vielzahl von allergischen Erkrankungen [Baraniuk, 2001; Howarth, 1997; Kraneveld and Nijkamp, 2001]. In dieser Hinsicht konnte die Induktion der Tachykininexpression in Atemwegsneuronen in einem Tiermodell des allergischen Asthma bronchiale nachgewiesen werden [Fischer, et al., 1996] und auch wurden erhöhte Tachykinin-Spiegel bei anderen allergischen Erkrankungen gefunden, wobei die Gesamtheit der Befunde für eine pro-inflammatorische Wirkung der tachykinerger Mediatoren spricht [Joos, et al., 2001; Scholzen, et al., 1998; Tai and Baraniuk, 2002].

1.3.2 Anti-inflammatorische peptiderge Mediatoren

Im Gegensatz zu den Mediatoren des exzitatorischen NANC-Systems, welchen in der jüngeren Vergangenheit eine aggravierende Rolle bei der Entstehung und Fortführung allergischer Erkrankungen zugeordnet wurde [Belvisi, 2003; Widdicombe, 2003], spiegeln andererseits die zum inhibitorischen NANC-System (i-NANC) gehörenden Mediatoren eine wesentlich inhomogenere Gruppe wider, deren Einflüsse bei allergischen Erkrankungen größtenteils noch ungeklärt sind. Zu den i-NANC Mediatoren gehören Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP) [Groneberg, et al., 2001], Neuropeptid Y (NPY) [Bedoui, et al.,

2003], das gasförmige Stickstoffmonoxid (NO) [Fischer, et al., 2002] oder auch endogene Opiode [Groneberg and Fischer, 2001]. In den vorliegenden Arbeiten wurde insbesondere der Einfluss des Mediators VIP an pathophysiologischen und pathobiochemischen Prozessen untersucht, weshalb seine Struktur und Funktion an dieser Stelle genauer erläutert werden.

1.3.3 Vasoaktives Intestinales Polypeptid

Unter der Vielzahl der potentiell anti-inflammatorischen Mediatoren spielt der 1969 von Said und Mutt identifizierte Mediator VIP eine besondere Rolle aufgrund zahlreicher tierexperimenteller Hinweise bezüglich immunmodulierender Effekte [Goetzl, et al., 2001] und seiner hohen Expression in Organen wie dem Atemtrakt oder der Haut [Groneberg, et al., 2001].

1.3.3.1 Struktur und Lokalisation

Das 28 Aminosäuren umfassende Polypeptid VIP wurde erstmals aus dem Duodenum aufgrund seiner vasodilatatorischen Effekte isoliert [Said and Mutt, 1969; Said and Mutt, 1970; Said and Mutt, 1970]. Das Gen des Mediators ist auf Chromosom 6q24 lokalisiert und kodiert Pro-VIP, welches ebenfalls die Sequenz des verwandten Mediators Peptide-Having-Carboxyterminal-Methionine (PHM-27) enthält [Gozes, et al., 1987]. Zusammen mit anderen Peptiden wie „Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide“ (PACAP), „Peptide Having Carboxy-terminal Methionine/Isoleucine“ (PHM/PHI), Peptide Histidine Valine (PHV), Sekretin, Glukagon, Growth hormone-releasing factor (GRF) und Helodermin bildet VIP eine Familie von Peptiden, die aufgrund

ähnlicher Strukturen durch eine Gemeinsamkeit mehrerer biologischer Effekte gekennzeichnet ist [Gozes and Brenneman, 1989].

VIP kann durch Enzyme wie Neutrale Endopeptidase (NEP) oder Mastzelltryptase inaktiviert werden, wobei humanes VIP hauptsächlich durch NEP zu inaktiven Metaboliten prozessiert wird [Hachisu, et al., 1991; Lilly, et al., 1993](Abb. 2).

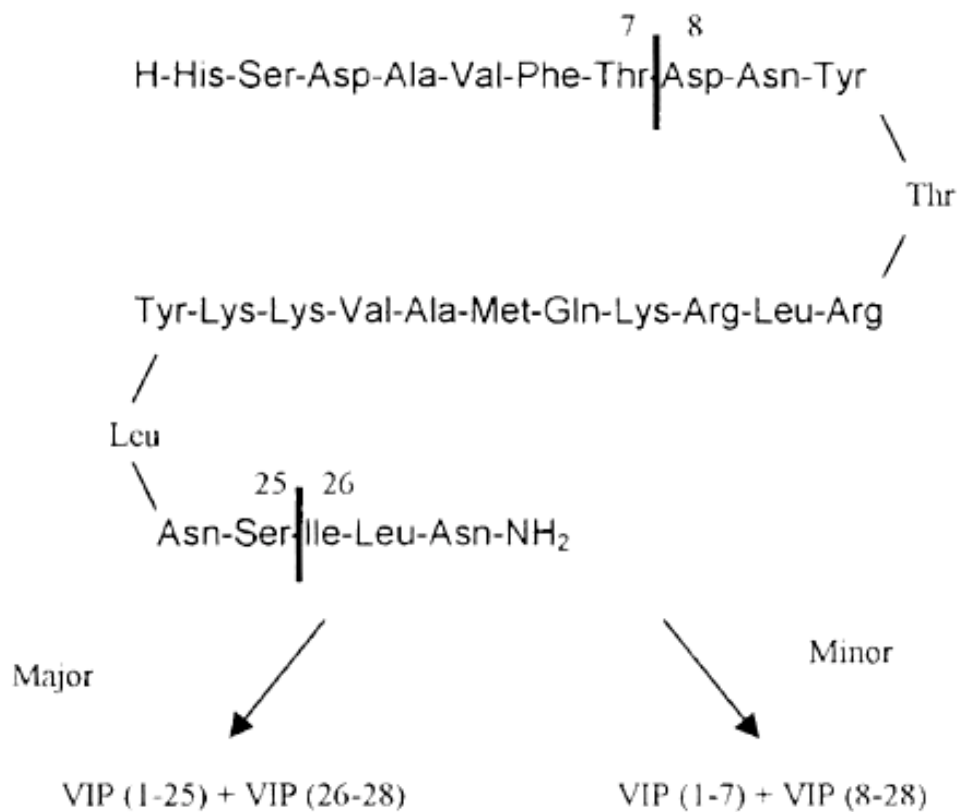


Abbildung 2: Enzymatische Inaktivierung von humanem VIP. Die Hauptstelle der Inaktivierung liegt bei Position Ser²⁵-Ile²⁶ während eine zweite Position bei Thr⁷ – Asp⁸ vorhanden ist (aus [Groneberg, et al., 2001]).

VIP-positive Nervenfasern konnten im humanen Atemtrakt im Bereich der glatten Muskulatur von Atemwegen und Gefäßen (Abb. 3), in der Umgebung von Drüsen und in der Lamina propria nachgewiesen werden, wobei die Faserdichte mit der Größe der Atemwege abnimmt [Baraniuk, et al., 1990; Lundberg, et al., 1984]. VIP wird je nach Spezies mit verschiedenen anderen Mediatoren koexprimiert. So wurde es beispielsweise im Atemtrakt des Meerschweinchens sowohl in sympathischen [Bowden and Gibbins, 1992] als auch parasympathischen [Fischer and Hoffmann, 1996] Nervenfasern nachgewiesen.

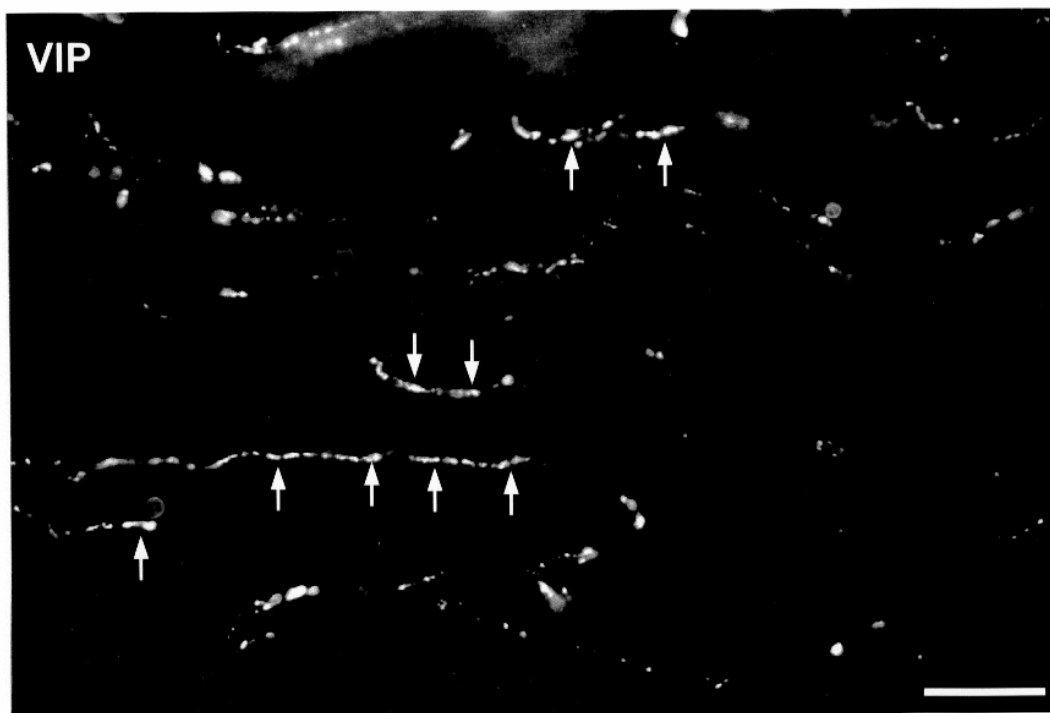


Abbildung 3: VIP-positive Nervenfasern in der glatten Muskulatur der humanen Trachea (aus [Groneberg, et al., 2001]).

Auf der Rezeptorebene konnten bis zur Durchführung der vorliegenden Arbeiten Bindungsstellen für VIP in den Atemwegen und der Haut nur durch autoradiographische Bindungsstudien mit niedriger Auflösung nachgewiesen werden [Carstairs and Barnes, 1986]. Demgegenüber standen seit der Identifizierung von VIP-Rezeptoren in den neunziger Jahren [Harmar, et al., 1998] und der Etablierung kombiniert molekularbiologisch-morphologischer Methoden wie der nicht-radioaktiven In Situ-Hybridisierung [Fischer, et al., 2002] Techniken zur Verfügung, die einen Nachweis von Rezeptoren für VIP auf der transkriptionellen Ebene ermöglichen können.

1.3.3.2 Rezeptoren

Nachdem in der Vergangenheit autoradiographische Bindungsstudien zur Lokalisation von VIP-Rezeptoren herangezogen wurden [Carstairs and Barnes, 1986], konnte durch die Klonierung zweier unterschiedlicher Rezeptoren eine molekularbiologische Grundlage für die vielfältigen Wirkungsmechanismen des Mediators VIP gefunden werden. Dabei handelt es sich bei den VIP-Rezeptoren um zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Abb. 4).

VPAC1-Rezeptor

Der VPAC1-Rezeptor war ursprünglich der einzig bekannte VIP-Rezeptor [Ishihara, et al., 1992]. Später wurde er in VIP₁-Rezeptor [Lutz, et al., 1993], VIP/PACAP Typ II Rezeptor [Ciccarelli, et al., 1994] und PVR 2 [Rawlings, et al., 1995] umbenannt. In der jüngsten Nomenklatur der Internationalen Union der Pharmakologie wurde der Rezeptor als VPAC₁ -Rezeptor terminiert [Harmar, et al., 1998]. Er wurde erstmals aus der Rattenlunge [Ishihara, et al., 1992] und später auch aus humanen Geweben isoliert [Couvineau, et al., 1994; Couvineau, et al., 1996]. Es sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine Splicevarianten bekannt. Demgegenüber existieren signifikante Spezies-spezifische Unterschiede in der Pharmakologie des Rezeptors [Sreedharan, et al., 1993]. Bis jetzt konnten mehrere VPAC₁ -Rezeptoragonisten beschrieben werden: Das VIP/GRF-Hybrid [Lys¹⁵, Arg¹⁶, Leu²⁷]VIP(1-7)GRF(8-27)-NH₂ stellt einen selektiven VPAC₁ -Rezeptoragonisten dar, der Growth hormone-releasing factor (GRF)-Rezeptoren nicht aktiviert [Gourlet, et al., 1997]. [Arg¹⁶]-

Sekretin ist ein Agonist von VPAC₁ - und Sekretinrezeptoren. [Acetyl-His¹, D-Phe², Lys¹⁵, Arg¹⁶] VIP (3-7)GRF(8-27)-NH₂ (PG 97-269) ist ein selektiver Antagonist von VPAC₁-Rezeptoren [Gourlet, et al., 1997].

VPAC2-Rezeptor

Ein zweiter, vormals als VIP₂-Rezeptor [Lutz, et al., 1993], PACAPR-3 [Inagaki, et al., 1994], oder PVR3 [Rawlings, et al., 1995] bezeichneter Rezeptor wurde in der letzten Nomenklatur VPAC₂-Rezeptor genannt [Harmar, et al., 1998]. Dieser Rezeptor bindet sowohl VIP als auch PACAP mit einer gleichwertigen Affinität und wurde in Geweben von Ratte [Lutz, et al., 1993; Usdin, et al., 1994], Maus [Inagaki, et al., 1994] und Mensch identifiziert [Svoboda, et al., 1994; Wei and Mojsos, 1996]. Auch bei diesem Rezeptor sind bislang keine Splicevarianten identifiziert worden. In Zelllinien exprimiert, bindet der Rezeptor VIP, PACAP-38, PACAP-27, sowie PHV und PHI. Demgegenüber besteht nur eine sehr geringe Affinität gegenüber GRF und Sekretin. Es gibt hochselektive VPAC₂-Agonisten, die von ihrer Struktur zyklische Peptide sind. Neben Ro 25-1553 [Gourlet, et al., 1997], welches zuerst als ein anti-inflammatorisches bronchorelaxierendes Medikament entwickelt wurde [O'Donnell, et al., 1994] [O'Donnell, et al., 1994], existiert Ro 25-1392 [Xia, et al., 1997].

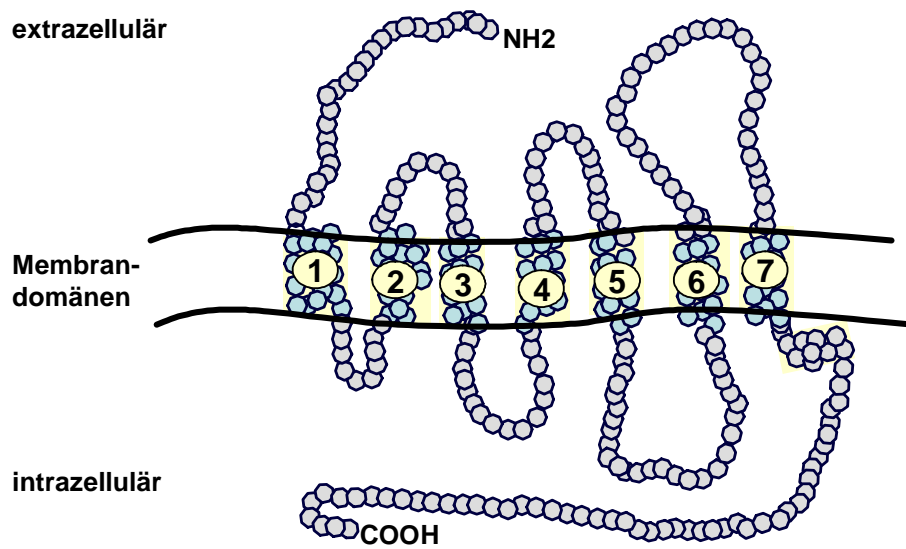


Abbildung 4: Struktur der VIP-Rezeptoren. Bei beiden Proteinen handelt es sich um G-Protein gekoppelte Membranproteine mit sieben Transmembrandomänen und einem intrazellulär gelegenen carboxyterminalen Ende.

1.3.3.3 Biologische Funktionen

Gefäßregulation

VIP wurde aufgrund seiner vasodilatorischen Eigenschaften identifiziert und gehört auch in den Atemwegen zu den stärksten endogenen Vasodilatoren. Dabei relaxiert es potent Gefäße in den oberen Atemwegen [Lundberg, et al., 1981; Lung and Widdicombe, 1987], Trachea, Bronchien [Laitinen, et al., 1987] sowie die Pulmonalarterien [Hamasaki, et al., 1983; Hamasaki, et al., 1983; Nandiwada, et al., 1985; Obara, et al., 1989]. Bezüglich der Stärke seiner Effekte konnte gezeigt werden, dass die VIP-induzierte Vasodilatation stärker in der trachealen als in der bronchialen Zirkulation ist [Matran, et al., 1989]. Darüber hinaus ist der vasodilatorische Effekt VIPs ca. zweihundertfach stärker als der von Prostazyklinen [Saga and Said, 1984] und unabhängig von der Integrität des Endothels [Barnes, et al., 1986; Greenberg, et al., 1987].

Atemwegsmuskulatur

VIP besitzt ebenfalls starke bronchodilatorische Eigenschaften *in vivo* und *in vitro*. Mit einer fast einhundertfach erhöhten bronchodilatorischen Potenz gegenüber Isoproterenol ist VIP der stärkste endogene Bronchodilator [Palmer, et al., 1986], wobei der Ort der maximalen Wirkung hauptsächlich im Bereich der zentralen Atemwege anzusiedeln ist. Die VIP-bedingte Bronchodilatation ist unabhängig von adrenergen oder cholinergen Rezeptoren oder Cyclooxygenasen [Altiere and Diamond, 1984; Hand, et al., 1984; Saga and Said, 1984]. Im Gegensatz zu Isoproterenol beziehen sich die Effekte VIPs eher auf die Resistance als auf die dynamische Compliance [Diamond, et al., 1983].

In dieser Hinsicht konnte ebenfalls gezeigt werden, dass VIP eine größenabhängige Wirkung zeigt, die parallel zu der Größe der Atemwege abnimmt [Altiere and Diamond, 1984]. Diese Wirkungsabnahme ist konsistent mit der Verteilung von VIP-positiven Nervenfasern, die in den peripheren Atemwegen ebenfalls abnimmt [Lundberg, et al., 1984]. So konnte auch autoradiographisch eine Abnahme von Bindungsstellen nachgewiesen werden [Carstairs and Barnes, 1986].

Trotz der *in vitro* nachgewiesenen starken bronchodilatorischen Effekte VIPs in humanen Atemwegen, die die Effekte anderer konstriktorischer Mediatoren wie Histamin, Prostaglandin $F_{2\alpha}$, Endothelin, Leukotriene D_4 , Kallikrein und NKA signifikant inhibiert [Boomsma and Said, 1992; Hamasaki, et al., 1983], konnte der Mediator aufgrund seiner starken vasodilatorischen Potenz nicht systemisch im klinischen Bereich eingesetzt werden.

Die inhalative Gabe von VIP führte trotz seiner berichteten Wirkung gegenüber der Histamin- und Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -induzierten Bronchokonstriktion in Kaninchen [Cox, et al., 1983] zu keinem signifikanten Effekt beim humanen Belastungs-Asthma [Bundgaard, et al., 1983]. Ebenso zeigten sich nur geringe Effekte bei der Histamin-induzierten Bronchokonstriktion beim Menschen [Altiere, et al., 1984]. Diese unerwartet schwachen Effekte nach inhalativer VIP-Gabe können durch eine mangelnde Penetration des Peptids durch das Bronchialepithel sowie durch eine schnelle Inaktivierung durch epitheliale Peptidasen erklärt werden [Altiere, et al., 1984; Morice, et al., 1983]. Aufgrund seiner Größe von 28 Aminosäuren kann der Mediator dabei nicht von Peptidtransportern wie PEPT1 und PEPT2 transportiert werden, die in den

Atemwegen [Groneberg, 2003; Groneberg, et al., 2002; Groneberg, et al., 2001] und dem peripheren Nervensystem [Groneberg, et al., 2001] exprimiert werden. Bezüglich einer mangelhaften Penetration nach inhalativer Gabe führte die Denudierung des Epithels zu einer Verstärkung der VIP-induzierten Relaxation von Trachealsegmenten [Sharaf, 1993]. Es zeigten auch Peptidase-resistente VIP-Analoga stärkere Effekte [Bolin, et al., 1993; Ito and Tachibana, 1991]. In jüngsten Arbeiten mit dem selektiven VPAC2-Rezeptoragonisten Ro 25-1553 konnte bei 24 Patienten mit moderatem Asthma nach Inhalation von 600 µg Ro 25-1553 ein mit Formoterol vergleichbarer bronchodilatatorischer Effekt innerhalb von drei Minuten nachgewiesen werden, der im Gegensatz zu Formoterol (24 h) allerdings nach fünf Stunden nachließ [Linden, et al., 2003]. Dieser klinischen Studie gingen *in vitro* Arbeiten voran, welche die dilatorische Potenz des Agonisten in der humanen Bronchialmuskulatur und in Pulmonalarterien bewiesen [Schmidt, et al., 2001].

Mukussekretion

Ein weiterer pathophysiologischer Mechanismus, der zu einer wesentlichen Verschlechterung der Atemfunktion bei schwerem Asthma bronchiale führen kann, ist die Mukushypersekretion. Dabei spielen in den oberen [Groneberg, et al., 2003] und unteren Atemwegen [Groneberg, et al., 2002] gebildete Muzinproteine die Matrix des Atemwegsmukus. Im Falle des fatalen Status asthmaticus können diese Proteine aufgrund einer massiven reflexartigen Sekretion zu der Verlegung der Atemwege und zum Tode führen [Groneberg, et al., 2002; Groneberg, et al., 2004].

Im Gegensatz zu der klaren Datenlage bezüglich der broncho- und vasodilatorischen Wirkung VIPs werden dessen regulatorische Effekte bezüglich der Mukussekretion kontrovers diskutiert. Es gibt ein enges Netzwerk VIP-positiver Nervenfasern im Bereich der Drüsen [Dey, et al., 1981], so dass die Partizipation VIPs in der Regulation der Drüsenaktivität nahe liegt. Demgegenüber wurden bis jetzt eine Reihe widersprüchlicher Ergebnisse zum Einfluss von VIP auf die Sekretion publiziert: Auf der einen Seite stehen Befunde, die eine Stimulation der Mukussekretion durch VIP in Frettchentrachealdrüsen [Peatfield, et al., 1983] oder Rattentrachealzellen [Wagner, et al., 1998] *in vitro* nachgewiesen haben. Auf der anderen Seite gibt es Arbeiten, die eine Inhibition der cholinerg-stimulierten Sekretion durch VIP in der Frettchentrachea *in vitro* nachweisen konnten [Webber and Widdicombe, 1987]. In der Trachea von Katzen wurde demgegenüber die cholinerg-stimulierte Sekretion durch VIP *in vitro* gefördert [Shimura, et al., 1988]. Für die Hundetrachea konnte schließlich gezeigt werden, dass VIP die aktive Sekretion

von Chlorid-Ionen *in vitro* stimuliert [Nathanson, et al., 1983]. Auch führte die Kombination von VIP mit anderen sekretorischen Agonisten zu Veränderungen in der Schleimsekretion. So wurde eine potente VIP-stimulierte Induktion der sekretorischen Antwort auf Phenylephrine berichtet [Richardson and Webber, 1987], sowie eine VIP-induzierte Zunahme der Zilienschlagfrequenz in kultivierten Kaninchentrachealepithelzellen, die durch Zugabe eines VIP-Antagonisten aufgehoben wurde [Sakai, et al., 1991].

Im Gegensatz zu den Befunden in Tiermodellen, die teilweise auf eine stimulierende Eigenschaft VIPs hindeuten, konnte für die humane Trachea *in vitro* bis jetzt nur ein inhibitorischer Effekt gegenüber Metacholin-stimulierter Glycoproteinsekretion gefunden werden [Coles, et al., 1981]. Im Bereich der oberen Atemwege konnte für Zellen aus der nasalen Mukosa *in vitro* gezeigt werden, dass VIP die Sekretion von Lactoferrin stimulieren kann, ohne jedoch eine große Wirkung auf Mukusglykoproteinsekretion zu haben [Baraniuk, et al., 1990].

Zur Klärung der Einflüsse VIPs auf die Mukussekretion wurde in Zusammenarbeit mit P. Staats und U. Wagner, Marburg, die Wirkung von VIP auf die basale Mukussekretion in der humanen Trachealzelllinie MM-39 untersucht (Abb. 5). Dabei konnte in dieser standardisierten Zelllinie [Merten, et al., 1996] mittels etablierter Messverfahren [Wagner, et al., 1998] gezeigt werden, dass VIP und der VPAC1 Rezeptor-Agonist [Ala 11,22,28]VIP die Mukussekretion Dosis-abhängig inhibieren.

Die Inhibition durch VIP wurde durch den PKA Inhibitor H-89 (100nM) aufgehoben, was auf einen Zusammenhang zwischen VIP-induzierter

cAMP/PKA Aktivität und Mukussekretion hindeutet. Letztlich stützten diese Daten aus einer humanen Drüsenzelllinie diejenigen Beobachtungen, die eine inhibitorische Wirkung des Mediators VIP *in vitro* für humane Atemwege aufzeigen [Coles, et al., 1981].

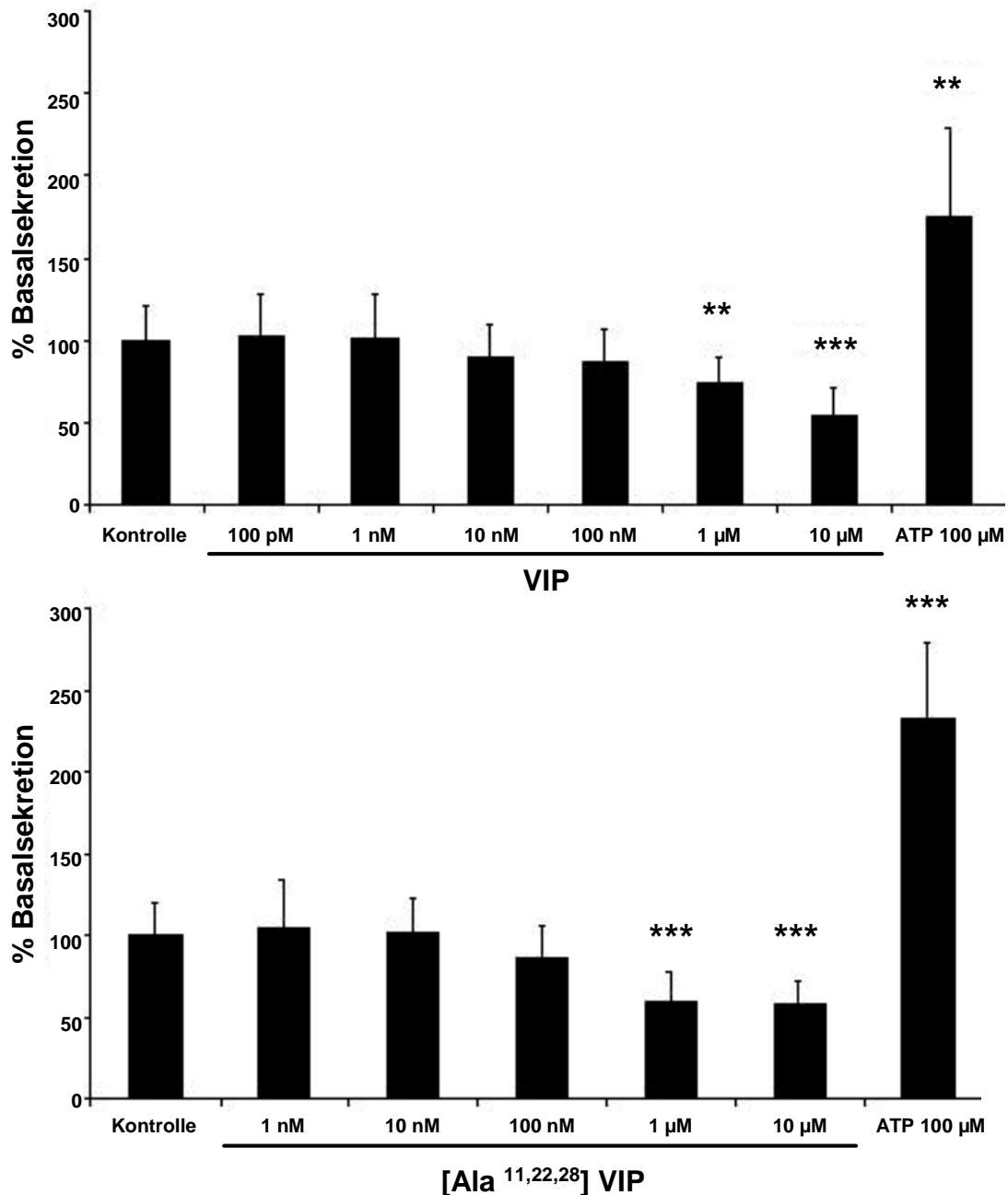


Abbildung 5: VIP-Effekte auf Mukusekretion in humanen MM-39 Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von VIP und [Ala^{11,22,28}] VIP über 30 min inkubiert. Die Ergebnisse der Experimente (je n= 10 für VIP und n = 5 für [Ala^{11,22,28}] VIP) wurden als Mittelwert ± SD der prozentualen basalen Sekretion von ³⁵SO₄ –markierten Makromolekülen dargestellt. **, p < 0.01, *, p < 0.001. Der Kolmogoroff-Smirnoff Test und Varianzanalyse dienen zur Überprüfung auf Signifikanzen gegenüber der Basalsekretion.**

1.4 Fragestellung und Ziel

Nach dem Kenntnisstand zu Beginn der experimentellen Untersuchungen der vorliegenden kumulativen Arbeit war bekannt, dass neben der Bedeutung pro-inflammatorischer Mediatoren wie Substanz P für die Atemwegsentzündung auch weitere, anti-inflammatorische Mediatoren eine regulatorische Rolle spielen können.

Allerdings fehlte zur Aufklärung der Rolle solcher anti-inflammatorischer peptiderger Mediatoren eine Vielzahl (patho-)physiologischer und (patho-)biochemischer Grundlagen. Im Gegensatz zu den Tachykininen war es für den potentiell anti-inflammatorischen Kandidaten VIP nicht klar, wo molekular definierte Rezeptoren in den Primärorganen allergisch-entzündlicher Erkrankungen, den oberen und unteren Atemwegen und der Haut, lokalisiert sind. Darüber hinaus fehlten Daten bezüglich der Regulation der Expression und Funktion verschiedener Mediatoren und Rezeptoren bei pathophysiologischen und pathobiochemischen Prozessen.

Unter der Annahme, dass anti-inflammatorische Mediatoren wie VIP eine bedeutende Rolle bei der Regulation entzündlicher Erkrankungen haben und möglicherweise ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren als zusätzlicher Mechanismus in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen bedeutsam ist, bestand die Zielstellung der Arbeit darin, am Beispiel von VIP zu neuen Erkenntnissen bezüglich der Rolle von peptidergen Entzündungsmediatoren zu gelangen.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

Wo sind potentielle Rezeptoren für VIP und verwandte Mediatoren in den Primärorganen allergisch-entzündlicher Erkrankungen lokalisiert?

Gibt es an Beispielen entzündlicher Erkrankungen der Atemwege krankheitsspezifische Änderungen des peptidergen Mediatorprofils?

Lässt sich am Beispiel der Hypoxie eine Regulation der Genexpression von Mediatorrezeptoren identifizieren?

Wie verhalten sich am Beispiel von c-Jun mit Mediatoren interferierende intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen bei allergisch-entzündlichen Erkrankungen?

2 Atemwege

2.1 Molekularbiologische Darstellung von VIP- Rezeptoren ¹

Die Expression und Genregulation von Rezeptoren kann aufgrund einer möglichen Veränderung der Rezeptorgenexpression bei pathophysiologischen Vorgängen eine ebenso große Bedeutung für das Krankheitsgeschehen haben wie die Genregulation der Mediatoren selbst. Trotz dieser potentiellen Rolle von VIP-Rezeptoren gab es in der Vergangenheit nur autoradiographische Bindungsstudien [Carstairs and Barnes, 1986] und unspezifische neurochemische Ansätze [Fischer, et al., 1992] zur Lokalisation von VIP- und PACAP-Rezeptoren.

Aufgrund dieser bislang fehlenden exakten proteinbiochemischen und molekularbiologischen Daten zur zellulären Lokalisation von VIP-Rezeptoren in den Atemwegen wurden in eigenen Studien nicht-radioaktive Hybridisierungssonden entwickelt. Ausgehend von Northern Blot Experimenten wurden diese Sonden für *In Situ*-Hybridisierungen verwendet, um eine Grundlage für spätere funktionelle Studien zu schaffen.

Nach der Konstruktion einer nicht-radioaktiven human-spezifischen VPAC2-Sonde, konnte in ersten Northern Blots die Expression der Rezeptor-mRNA in humanen Atemwegsextrakten nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten sich Signale für VPAC2-mRNA in weiteren Organen wie Herz, zentralem Nervensystem, Skelettmuskulatur, Pankreas, Leber und Niere. Diese humanen

¹ D. A. Groneberg, P. Hartmann, Q. T. Dinh, A. Fischer. Expression and distribution of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human airways. Lab. Invest. 81: 749-755 (2001).

Befunde stimmten mit Ergebnissen aus der Spezies Ratte überein [Ishihara, et al., 1992].

In einem nächsten Schritt wurde die zelluläre Expression des Rezeptors auf der molekularbiologischen Ebene untersucht. Dazu wurde die mRNA des VPAC2-Rezeptors in makroskopisch und mikroskopisch unauffälligen Abschnitten humaner Atemwege mittels nicht-radioaktiver *In Situ*-Hybridisierung und Phasenkontrastinterferenzmikroskopie dargestellt.

In allen Abschnitten der untersuchten Gewebe wurden Signale für die mRNA des Rezeptors durch Hybridisierungen mit Rezeptor-Antisense-Sonden reproduzierbar gefunden. Demgegenüber führten Kontrolluntersuchungen mit Rezeptor-Sense-Sonden bei gleichen Bedingungen zu keinen spezifischen Signalen. In der Trachea und extra- sowie intrapulmonalen Bronchien zeigten sich VPAC2-mRNA-Signale in basalen sowie zilientragenden Atemwegsepithelzellen, wohingegen Becherzellen negativ waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass zilientragende Epithelzellen das morphologische Korrelat der früher berichteten Bindung von radioaktiv markiertem VIP im Bereich des Atemwegsepithels [Carstairs and Barnes, 1986] bezüglich VPAC2 darstellen, wohingegen Becherzellen keine VPAC2-mRNA exprimieren.

Darüber hinaus wurden ebenfalls keine Signale in Arealen der glatten Atemwegsmuskulatur sowie in der Gefäßmuskulatur gefunden. Diese Befunde widersprechen früher gemachten Beobachtungen [Carstairs and Barnes, 1986]. Da auch moderne Arbeiten mittels Rezeptor-spezifischen Antikörpern VPAC2-Protein im Bereich der glatten Muskulatur von Rattenatemwegen nachweisen konnten [Busto, et al., 2000], stehen möglicherweise nicht genügend VPAC2-

mRNA Kopien in den Myozyten der Atemwegsmuskulatur zur Verfügung, um eine Detektion durch *In Situ*-Hybridisierung zu ermöglichen. Zukünftige Studien, die sich hochsensitiver Verfahren zur Lokalisation von mRNA wie der Lasermikrodissektions-gestützten RT-PCR [Peiser, et al., 2002] bedienen, werden diese divergierenden Ergebnisse auflösen können.

Ebenfalls waren Bindegewebszellen und Knorpelzellen areaktiv, wobei diese Ergebnisse ebenfalls im Einklang mit den früher durchgeführten Studien stehen [Carstairs and Barnes, 1986; Fischer, et al., 1992]. Im Gegensatz dazu zeigten sich VPAC2-mRNA Signale im Bereich der submukösen Drüsen. Hier waren sowohl muköse als auch seröse Drüsenabschnitte positiv für die Rezeptor-mRNA. Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten der Trachea, extra- sowie intrapulmonalen Atemwegen waren dabei nicht evident. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass VPAC2 auf der funktionellen Ebene die Effekte von VIP auf die Drüsensekretion steuert. Diese Effekte scheinen in den menschlichen Atemwegen inhibierend zu sein [Coles, et al., 1981], obgleich in anderen Spezies auch stimulierende Effekte nachgewiesen wurden [Peatfield, et al., 1983].

In der peripheren Lunge zeigte sich das Epithel kleiner Bronchiolen ebenfalls positiv für VPAC2-mRNA. Im Alveolarbereich zeigten Alveolarmakrophagen VPAC2-mRNA Signale. Ebenfalls wurde VPAC2-mRNA in peribronchialen Immunzellen gefunden. Diese morphologischen Daten weisen auf eine Rolle VIPs in der lokalen Modulation von Immunreaktionen hin, die durch jüngste Studien mit VPAC2-Gen-depletierten und VPAC2-transgenen Mäusen auf der

tierexperimentellen Ebene hervorgehoben werden konnten [Goetzl, et al., 2001; Voice, et al., 2001].

2.2 Änderungen unter pathophysiologischen Bedingungen

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit ein Überblick über die Expression von VIP-Rezeptoren in den Atemwegen gewonnen wurde, sollten im zweiten Teil Veränderungen im Expressionsprofil VIPs und anderer pro- und anti-inflammatorischer Mediatoren unter den pathophysiologischen Bedingungen der Atemwegsentzündung erfasst werden. Dabei boten sich aufgrund der möglichen Klassifizierungen entzündliche Erkrankungen der oberen Atemwege an. Am Beispiel der Rhinitis, welche im Rahmen der „United Airways“-Hypothese [Togias, 2003] in ihrer allergischen Form zu einem Vorläufer des allergischen Asthma bronchiale werden kann, sollten Subgruppen-spezifische Veränderungen der Expression peptiderger Mediatoren untersucht werden. Aufgrund klinischer und pathologischer Kriterien lässt sich die Rhinitis in die einzelnen Entitäten toxische Rhinitis, Aspirin-sensitive Rhinitis, saisonal-allergische Rhinitis, perennial-allergische Rhinitis sowie hyperreflektorische (vasomotorische) Rhinitis unterteilen, wobei letztere eine Ausschlussdiagnose darstellt [Lund, 1998].

2.2.1 Toxische Rhinitis²

Die irritativ-toxische Rhinitis ist eine Erkrankung der oberen Atemwege, welche durch eine chronische Exposition gegenüber arbeits- und umweltmedizinisch relevanten Noxen wie beispielsweise Ozon, Formaldehyd, Nickel, Chrom, Lösungsmittelinhaltsstoffe und Tabakrauch entstehen kann [Jones, 1988]. Diese Noxen können durch komplexe neuro-immune Wechselwirkungen Effekte auf das Mediatorprofil der Atemwege haben [Jones, 1997]. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden neben VIP die weiteren Mediatoren NPY, CGRP und SP hinsichtlich einer veränderten Expression in Atemwegsnerven untersucht. Histologisch zeigten sich charakteristische Veränderungen der Nasenschleimhaut von Patienten mit toxischer Rhinitis, wie beispielsweise metaplastische Epithelveränderungen oder Entzündungszellen. Mittels des Nervenmarkers Protein Gene Product (PGP) 9.5 wurde zuerst die allgemeine Innervation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht. Dabei zeigten sich qualitativ keine Unterschiede. VIP-positive Nervenfasern waren hauptsächlich in der Nähe von submukösen Drüsenarealen sowie Gefäßen zu finden, während NPY-positive Fasern hauptsächlich Gefäßstrukturen innervierten. CGRP-positive Nervenfasern projizierten zu Sinusoiden, Gefäßen sowie Drüsen und SP-positive Fasern zeigten sich besonders unterhalb des Epithels sowie im Bereich von Drüsen und Gefäßen. Diese Daten stimmen mit früher erzielten Ergebnissen zur

² D. A. Groneberg, W. Heppt, A. Cryer, A. Wussow, C. Peiser, M. Zweng, Q. T. Dinh, C. Witt, A. Fischer. Toxic rhinitis-induced changes of human nasal mucosa innervation. *Toxicol. Pathol.* 31(3): 326-331 (2003).

Lokalisation von Neuropeptiden überein [Albegger, et al., 1991; Baraniuk, et al., 1990; Baraniuk, et al., 1990]. Mittels semiquantitativer Auswertung der Innervationsdichte konnte im Anschluss eine signifikante Erhöhung von VIP-positiven Fasern in der Nasenschleimhaut von Patienten mit toxischer Rhinitis gezeigt werden mit relativen Werten der Innervationsdichte von 2.83 ± 0.31 , vs. 1.27 ± 0.47 (Kontrolle), $p < 0.04$. Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Innervationsdichte von NPY-positiven Fasern im Patientenkollektiv (3.17 ± 0.31 , vs. 0.91 ± 0.37 Kontrolle, $p < 0.001$). Im Gegensatz dazu waren die Werte von SP und CGRP nicht signifikant verändert. Diese Daten weisen auf eine Änderung des Profils peptiderger Neuromediatoren bei toxischer Rhinitis hin.

Zu den Hauptsymptomen der toxischen Rhinitis gehören nasale Obstruktion sowie trockene Schleimhäute, welche auch durch chronisches Tabakrauchen verursacht werden können [Dessi, et al., 1994]. In dieser Hinsicht ist eine Induktion verschiedener Mediatorgene wie beispielsweise von NPY in Atemwegsnerven durch exogene Noxen möglich. Ebenso können anti-inflammatorische Mediatoren wie VIP reaktiv erhöht sein. Betrachtet man die biologischen Effekte von NPY und VIP, so ist beispielsweise eine Beteiligung beider Mediatoren am Symptom der trockenen Schleimhäute möglich. Dabei können erhöhte NPY-Spiegel zu einer Verstärkung der Vasokonstriktion [Lacroix, et al., 1997] und erhöhte VIP-Spiegel zu einer Reduktion der protektiven Mukusbildung führen.

2.2.2 Hyperreflektorische Rhinitis³

Die hyperreflektorische Rhinitis (auch vasomotorische oder idiopathische Rhinitis) ist neben der toxischen Rhinitis eine weitere häufige Erkrankungsform der oberen Atemwege mit einer Erkrankungshäufung zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr. Als Ursache wird eine unspezifische Hyperreagibilität vermutet. Letztlich ist die hyperreflektorische Rhinitis jedoch eine Ausschlussdiagnose mit einer limitierten, symptomatischen Behandlung [Mikaelian, 1989]. Aufgrund einer vielfach postulierten Beteiligung neuronaler Mediatoren bei der Entstehung und Progression der Erkrankung und zur Abgrenzung von anderen Rhinitisformen, wurde das Profil der Mediatoren VIP, SP, NPY und CGRP untersucht.

Die histopathologische Untersuchung zeigte chronisch-entzündliche Veränderungen in den Geweben von Patienten mit hyperreflektorischer Rhinitis verglichen mit Kontrollgeweben, wobei das histopathologische Bild mit früheren Beschreibungen übereinstimmte [Mikaelian, 1989]. Eine Quantifizierung der Mastzellen mittels proteinbiochemischer Mastzellmarker (Tryptase, IgE) sowie histochemischer Markierung (Tolluidin-Blau) zeigte keine signifikanten Unterschiede in Mastzellzahlen zwischen Patienten mit hyperreflektorischer Rhinitis und Kontrollen (Tolluidin-Blau: 6.5 +/- 4.8 % vs. 6.6 +/- 3.2 % Kontrolle; Anti-Tryptase: 7.8 +/- 3.9 % vs. 6.8 +/- 3.2 % Kontrolle; Anti-IgE: 7.1 +/- 4.3 %

³ W. Heppt, C. Peiser, A. Cryer, Q. T. Dinh, M. Zweng, C. Witt, A. Fischer, D. A. Groneberg. Innervation of human nasal mucosa in environmentally triggered hyperreflectoric rhinitis. J. Occup. Environ. Med. 44(10): 924-929 (2002).

vs. 6.5 +/- 3.5 % Kontrolle). Dieser beobachtete Sachverhalt lässt ebenfalls auf eine nicht-allergische Ursache dieser chronischen Entzündungsform schließen, wobei jegliche Hinweise auf Atopien in der Vorgeschichte ein Ausschlusskriterium darstellen [Lund, 1998].

Die in einem nächsten Schritt durchgeführte proteinbiochemische Darstellung des Nervenmarkers PGP9.5 und der Mediatoren VIP, SP, CGRP und NPY zeigte in den Kontrollgeweben eine regelrechte Distribution der einzelnen Marker, die in Übereinstimmung mit früheren Berichten war [Albegger, et al., 1991; Baraniuk, et al., 1990]. Dabei zeigten sich ebenfalls qualitativ keine Unterschiede zwischen den Geweben von Patienten mit hyperreflektorischer Rhinitis und den Kontrollgeweben. Die im Anschluss durchgeführte semiquantitative Erfassung des Mediatorprofils ergab jedoch signifikante Unterschiede zwischen den pathologisch veränderten Geweben und den gesunden Kontrollen. In dieser Hinsicht zeigten sich Subkompartiment-spezifische Unterschiede: In den Kontrollgeweben wurden relative Innervationsdichten von 1.64 ± 0.39 für SP, von 1.36 ± 0.34 für CGRP, von 0.82 ± 0.33 für VIP und von 0.55 ± 0.25 für NPY festgestellt. Demgegenüber gab es eine signifikante Erhöhung der Innervationsdichte bei hyperreflektorischer Rhinitis für SP (3.00 ± 0.37 , $p < 0.04$), NPY (1.40 ± 0.75) und VIP (2.33 ± 0.42 , $p < 0.02$).

Auch diese Befunde weisen auf eine Rolle peptiderger Neuromediatoren bei dieser Form der Rhinitis hin. Im Gegensatz zur toxischen Rhinitis, die durch eine Erhöhung von VIP- und NPY-Fasern gekennzeichnet ist (s. 2.2.1), war das

Mediatorprofil bei der hyperreflektorischen Rhinitis allerdings von einer vermehrten Anzahl SP- und VIP- positiver Nervenfasern geprägt.

Dabei kann die Erhöhung der SP-positiven Fasern in der Schleimhaut der oberen Atemwege die Induktion einer neuronalen Plastizität in den zur Nasenschleimhaut projizierenden Neuronen durch einen unspezifischen Stimulus widerspiegeln. Diesbezüglich konnten tierexperimentelle Studien eine Allergen-spezifische Induktion von Tachykininen in Atemwegsneuronen von Meerschweinchen nachweisen [Fischer, et al., 1996], wobei ein Allergen-abhängiger Mechanismus bei der hyperreflektorischen Rhinitis ausgeschlossen werden kann. Die Expression von Substanz P könnte auch eine zunehmende Aggravation der chronisch-entzündlichen Veränderungen widerspiegeln, wobei den Tachykininen auch eine starke, Sauerstoffradikal-abhängige Epithel-schädigende Wirkung zugesprochen wird (J. Springer, persönliche Mitteilung).

2.2.3 Aspirin-sensitive Rhinitis 4

Die Aspirin-sensitive Rhinitis stellt die Manifestation der Aspirin-Intoleranz in den oberen Atemwegen dar [Szczeklik and Stevenson, 1999]. Es handelt sich bei dieser Erkrankung wie auch beim Aspirin-sensitiven Asthma um eine Pseudoallergie gegenüber Acetylsalicylsäure (Aspirin) oder verwandten nicht-steroidalen Antiphlogistika [Babu and Salvi, 2000]. Aufgrund der postulierten Beteiligung neuronaler Mediatoren bei der Entstehung und Aufrechterhaltung

⁴ D. A. Groneberg, W. Heppt, P. Welker, C. Peiser, Q. T. Dinh, A. Cryer, M. Zweng, C. Witt., A. Fischer. Aspirin-sensitive rhinitis associated changes in upper airway innervation. Eur. Respir. J. Im Druck (2003).

der Erkrankung sowie zur Abgrenzung gegenüber anderen Rhinitisformen wurden Veränderungen des Expressionsprofils verschiedener Mediatoren bei Aspirin-sensitiver Rhinitis analysiert.

Histologische Untersuchungen der Präparate zeigten entzündliche Veränderungen in Geweben mit Aspirin-sensitiver Rhinitis. Neben dem Einwandern von Entzündungszellen zeigten sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine Eosinophilie sowie eine Becherzellhyperplasie. Ähnliche Befunde wurden bereits früher erhoben und kennzeichnen das histopathologische Bild der Erkrankung [Kowalski, 2000]. Giemsa-Färbungen zeigten, dass die Eosinophilen hauptsächlich in subepithelialen Bereichen lokalisiert waren, sowie in der Nähe von Drüsen und kleinen Gefäßen. Mastzellen konnten durch Toluidin-Färbungen im Bereich von Drüsen und Gefäßen lokalisiert werden.

Eine Quantifizierung der Mastzellen und Eosinophilen wurde daraufhin mittels quantitativer Histochemie (Toluidin- und Giemsa) sowie Proteinbiochemie (Mastzell- und Eosinophilenmarker) durchgeführt. Dabei wurden in der Aspirin-sensitiven Rhinitis Gruppe ein hoch-signifikanter Anstieg der Eosinophilenzahlen gefunden: Der Eosinophilenmarker EG1 ergab einen Wert von $18.7 \pm 4.9 \%$ (Kontrolle: $2.6 \pm 1.3 \%$, $p < 0.001$) und der Marker EG2 einen Wert von $21.1 \pm 6.9 \%$ (Kontrolle: $2.7 \pm 1.2 \%$, $p < 0.001$). Im Gegensatz dazu wurden keine signifikanten Veränderungen der Mastzellzahlen gefunden (Toluidin: $6.6 \pm 0.9 \%$ vs. $6.5 \pm 0.7 \%$ Kontrolle, $p = 0.921$, Tryptase: $6.8 \pm 1.0 \%$ vs. $7.9 \pm 1.0 \%$ Kontrolle, $p = 0.309$). Diese Befunde korrelieren mit der den Eosinophilen zugewiesenen Bedeutung [Szczeklik and Stevenson, 1999] und

widersprechen vereinzelt Berichten [Fischer, et al., 1994], die den Mastzellen eine besondere Bedeutung bei der Pathogenese der Erkrankung zusprechen, wenngleich dieser Zelltyp trotz unveränderter Zellzahlen auch vermehrt aktiviert sein kann.

Nach der Untersuchung der zellulären Lokalisation der einzelnen Mediatoren, die eine regelrechte Expression in Nervenfasern ohne qualitative Unterschiede zwischen Rhinitis und normalen Geweben zeigte, wurden quantitative Methoden zur Erfassung einer Veränderung des Mediatorprofils durchgeführt. Dabei zeigte sich auch bei dieser Erkrankung eine Subkompartiment-spezifische Veränderung des Mediatorprofils. Im Gegensatz zu SP, NPY und CGRP konnte eine signifikante Erhöhung nur für VIP-positive Fasern in der Mukosa von Patienten mit Aspirin-sensitiver Rhinitis festgestellt werden (2.50 ± 0.26 vs. 1.42 ± 0.45 Kontrolle, $p < 0.05$).

Mit der Beobachtung einer Veränderung des Mediatorprofils in der Nasenschleimhaut konnte in dieser Arbeit ein Bezug zwischen immunologischen und neurovegetativen Mechanismen bei der Aspirin-sensitiven Rhinitis hergestellt werden, welcher die postulierte Bedeutung des autonomen Nervensystems innerhalb der Physiologie und Pathophysiologie der Atemwege [Takeda, et al., 1993] unterstreicht. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es wahrscheinlich nicht nur die häufig diskutierten Interaktionen zwischen Atemwegsnerven und Mastzellen gibt [Bienenstock, et al., 1991], sondern dass auch eine Vielzahl anderer Zellen wie Eosinophile, dendritische Zellen oder auch T-Zellen und Makrophagen mit neuronalen Zellen und deren Mediatoren in Kontakt stehen können. Letztlich zeigen die für die Aspirin-

sensitive Rhinitis gewonnenen Daten auch, dass es innerhalb der verschiedenen Rhinitisformen wesentliche Unterschiede bezüglich der Expression von peptidergen Mediatoren in Atemwegsneuronen gibt. Während bei der toxischen Rhinitis VIP- und NPY-positive Fasern in ihrer Anzahl erhöht waren, so standen bei der hyperreflektorischen Rhinitis VIP- und Substanz P-positive Fasern im Vordergrund und bei der Aspirin-sensitiven Rhinitis nur VIP-positive Fasern. Diese Unterschiede weisen darauf hin, dass die Induktion peptiderger Neuromediatoren nicht nur als ein reines Epiphänomen entzündlicher Erkrankungen zu betrachten ist, sondern dass es krankheitsspezifische Ursachen der differenziellen Induktion geben muss.

In zukünftigen Studien soll die weitere Analyse der saisonalen und perennialen allergischen Rhinitisformen zu einem umfassenderen Bild der Rolle verschiedener Neuromediatoren bei allergischen und nicht-allergischen Atemwegsentzündungen führen. Darüber hinaus ist eine weiterführende Betrachtung der Ebene der Rezeptorexpression und -regulation von entscheidender Bedeutung für das Verständnis neuroimmunologischer Grundlagen entzündlicher Erkrankungen.

2.2.4 Identifizierung eines Hypoxie-regulierten G-Protein-gekoppelten Rezeptors⁵

Eine Vielzahl von Atemwegserkrankungen geht mit einer respiratorischen Hypoxie einher. In Anbetracht der Tatsache, dass die Genexpression einzelner Mediatoren wie beispielsweise CGRP, Substanz P oder VIP unter den pathophysiologischen Bedingungen der Hypoxie induziert sein kann [Keith, 2000; Kusakabe, et al., 2003], ist auch mit einer Induktion von Rezeptoren einzelner Mediatoren zu rechnen. In den folgenden Studien wurde ein G-Protein gekoppelter humaner Rezeptor charakterisiert, der im Atemwegsepithel exprimiert und unter Hypoxie induziert wird.

Basierend auf der cDNA-Sequenz wurde ein 3.4 kb genomisches DNA Fragment durch PCR-Techniken identifiziert. Sequenzierung und Vergleich mit der cDNA Sequenz zeigte ein Intron von 544 bp in der 5'- nicht-translatierten Region, welches von einem Exon gefolgt wurde. Dieses Exon kodiert für das Rezeptorprotein von 404 Aminosäuren. Das Gen wurde auf dem humanen Chromosom 12q lokalisiert. Die weitere Identifikation molekularbiologisch relevanter Genabschnitte zeigte, dass die 5'- regulatorische Region mehrere SP1-, AP2- und CAAT-Stellen beinhaltet. Darüber hinaus wurden Hypoxie-responsive Elemente („hypoxia responsive elements“, HRE) sowohl in der 5'- als auch 3'-regulatorischen Region gefunden.

⁵ J. H äze, D. A. Groneberg, F. Rose, A. Hanisch, J. D ösch, C. Peiser, W. Seeger, W. Rascher, A. Fischer, F. Grimminger. Genomic organization and regulation of a human 7-helix transmembrane receptor which is expressed in pulmonary epithelial cells and induced in hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:1160-1165 (2002).

RT-PCR mit Intron-überspannenden Primern zum Ausschluss der Amplifizierung genomischer DNA zeigte mRNA-Signale in den Atemwegen, Leber, Niere, Herz und Skelettmuskulatur. Auf der transkriptionellen Ebene wurde die Expression der Rezeptor-mRNA durch nicht-radioaktive *In Situ*-Hybridisierungen in Atemwegsepithelzellen und Typ II Pneumozyten lokalisiert. Darüber hinaus wurde das Verhalten des Rezeptors gegenüber Hypoxie in Zellkulturversuchen untersucht. Nach der Identifikation des Rezeptors mittels RT-PCR in den beiden pulmonalen Epithelzelllinien H23 und A549 wurde die Induktion durch Hypoxie mittels SYBR-Green Realtime-PCR charakterisiert. Bei der quantitativen Analyse der Induktion wurden neben der Rezeptor-mRNA das Housekeeping-Gen Porphobilinogen-Deamidase (PBGD) sowie der Hypoxiemarker Phosphoglycerat-Kinase-1 (PGK) untersucht. Nach 24-stündiger Hypoxie zeigte sich eine vierfache Induktion der PGK-mRNA und eine dreifache Induktion der Rezeptor-mRNA, welche auf die biologische Funktion der identifizierten HRE Stellen hinweisen.

Ursprünglich wurde das Rattenhomolog des Rezeptors als Adrenomedullinrezeptor eingeordnet [Kapas, et al., 1995], wobei spätere Studien keine Bindung des Liganden nachweisen konnten, so dass der Rezeptor momentan als ein Orphan-Rezeptor einzustufen ist [Kennedy, et al., 1998].

Bezüglich der Induktion des Rezeptors durch Hypoxie aufgrund der hier molekularbiologisch nachgewiesenen HRE-Stellen weisen die in dieser Arbeit gewonnen Daten auf eine Bedeutung des Rezeptors bei der Regulation pathophysiologischer Mechanismen im Atemtrakt hin. Die Sequenz des

Rezeptors deutet auf eine den VIP-Rezeptoren ähnliche Struktur mit sieben Transmembrandomänen hin (Abb. 4).

In den vergangenen Jahren wurde die Existenz sogenannter Rezeptoraktivitäts-modifizierender Proteine (RAMPs) beschrieben [Foord and Marshall, 1999]. Sie können die Affinität eines Rezeptors beeinflussen, so dass ohne ihre Koexpression der Rezeptor keine Liganden bindet [Sexton, et al., 2001]. Mit Hilfe der Koexpression dieser RAMPs können zukünftige Studien die Liganden-Identität des hier molekular charakterisierten Rezeptors nachweisen, um danach die Betrachtung der Rolle des Rezeptors im Rahmen weiterer pathophysiologischer Aspekte zu ermöglichen.

3 Haut

Neben den oberen und unteren Atemwegen stellt die Haut ein Primärorgan allergisch-entzündlicher Erkrankungen dar. In diesem Organ manifestiert sich die auch Neurodermitis bezeichnete atopische Dermatitis, die eine sozioökonomisch immer bedeutsamere Erkrankung darstellt [Kemp, 2003]. Es ist eine meist schon im Kleinkindalter auftretende chronisch-rezidivierende entzündliche Hauterkrankung, die mit einem starken Juckreiz verbunden ist und deren Ausprägung von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren bestimmt wird [Leung and Bieber, 2003].

Die Erkrankung basiert auf einer Entzündung der Epidermis wie auch der Dermis. Je nach Intensität und Dauer kommt es zu Hautrötung und Schwellung, die bis zu der Bildung von Blasen und nässenden Erosionen reichen können. Bei einem Fortbestehen geht die Entzündung in ein chronisches Ekzem über, welches durch eine trockene, schuppige Haut mit Vergröberung des Oberflächenreliefs und Lichenifikation charakterisiert ist [Galli, et al., 2003].

Auch bei dieser im Kindes-, Jugend- und Erwachsenenalter bedeutsamen chronisch-entzündlichen Erkrankung spielen neurogene Mediatoren wie VIP oder Tachykinine wahrscheinlich eine hervorgehobene Rolle. In dieser Hinsicht deutete bereits der klassische Name „Neurodermitis“ auf eine Beteiligung des Nervensystems hin. Trotzdem gab es auch auf diesem Gebiet zu Beginn der vorliegenden Arbeiten nur sehr wenige Anhaltspunkte bezüglich des Vorkommens und der Regulation von potentiell anti-inflammatorischen Mediatoren wie VIP.

3.1 Mediatorprofil in der Haut unter normalen Bedingungen ⁶

Neben der Rolle VIPs in der Regulation pathophysiologischer und pathobiochemischer Prozesse im Atemtrakt wurde ebenfalls eine wesentliche regulatorische Funktion des Mediators für die Haut postuliert [Wallengren, 1997].

Im Gegensatz zu Studien, die die Verteilung des Liganden VIP unter physiologischen Bedingungen in der Haut und Hautanhangsgebilden charakterisieren konnten [Eedy, et al., 1994], gab es keine Daten bezüglich der kutanen Expression molekular definierter Rezeptoren für VIP. Aus diesem Grunde wurden *In Situ*-Hybridisierungen durchgeführt, um die VPAC2-Expression auf der transkriptionellen Ebene in der Haut darzustellen und in Bezug zu der Verteilung VIP-positiver Nervenfasern zu stellen.

Dabei wurde nach der immunhistochemischen Detektion von VIP in kutanen Nervenfasern durch den Einsatz einer human-spezifischen VPAC2-Sonde die zelluläre Expression des Rezeptors durch Phasenkontrast-interferenzmikroskopie dargestellt. Es zeigten sich in allen untersuchten Geweben reproduzierbare Signale für VPAC2-mRNA nach Hybridisierung mit der Antisense-Sonde. Im Gegensatz dazu führten Kontrolluntersuchungen mit der Sense-Sonde bei ansonst identischen Bedingungen zu keinen spezifischen Signalen für VPAC2-mRNA.

⁶ T. C. Fischer, P. Hartmann, C. L. Sörer, J. Springer, C. Peiser, Q. T. Dinh, A. Fischer, D. A. Groneberg. Abundant expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor VPAC₂ mRNA in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 117(3): 754-756 (2001).

Die mRNA des Rezeptors wurde in einer Vielzahl kutaner Zelltypen identifiziert. So wurde beispielsweise die Expression der VPAC2-mRNA in Keratinozyten mit einer Betonung des Signals in basalen Schichten nachgewiesen, was auf VPAC2-vermittelte Effekte des Mediators in Keratinozyten schließen lässt. In dieser Hinsicht zeigten bereits frühere *in vitro* Studien einen Effekt VIPs auf kultivierte Keratinozyten [Haegerstrand, et al., 1989]. Dabei wurde berichtet, dass lokal freigesetztes VIP als mitogenes Stimulans eine cAMP-vermittelte Keratinozytenproliferation induzieren könne. Die hier *in situ* nachgewiesene Expression von VPAC2 in humanen Keratinozyten lässt darauf schließen, dass VPAC2 bei der Vermittlung dieser Effekte mitwirkt.

Neben der Expression der Rezeptor-mRNA in Keratinozyten zeigten unter anderem von VIP-positiven Nervenfasern umgebene glanduläre Zellen ebenfalls VPAC2-mRNA-spezifische Hybridisierungssignale, die auf eine Rolle VIPs bei der autonomen Regulation der ekkrinen Drüsenfunktion schließen lassen kann. Unterstützt wird diese Hypothese durch frühere funktionelle Studien [Tainio, 1987], die eine cAMP-vermittelte Stimulation der Drüsenfunktion in Ratten nachweisen konnten.

Auch wiesen Haarfollikelzellen eine Expression des Rezeptors auf der transkriptionellen Ebene auf. Im Hinblick auf die in der jüngsten Zeit publizierten Einflüsse verschiedener Neuromediatoren wie beispielsweise Neurotrophin-3 [Botchkarev, et al., 1998], brain-derived neurotrophic factor [Botchkarev, et al., 1998], oder Substanz P [Arck, et al., 2001] auf das Haarwachstum, stellt VIP einen weiteren Kandidaten dar, der in zukünftigen Studien bezüglich seiner Funktion bei der Haarfollikelreifung zu untersuchen ist. Spezifische Signale

waren ebenfalls in Endothelzellen sichtbar, wobei hier aufgrund des Fehlens von VPAC2-mRNA in der Gefäßmuskulatur an eine Teilnahme dieser Zellen an der Vermittlung vasodilatatorischer Effekte VIPs zu denken ist. Darüber hinaus waren VPAC2-mRNA positive Entzündungszellen sichtbar, die aufgrund der potentiellen Bedeutung VIPs bei der Immunmodulation entzündlicher Erkrankungen [Gomariz, et al., 2001] zu den unter Kap. 3.2 beschriebenen Folgestudien führten.

3.2 Funktionelle Regulation von VIP-Rezeptoren bei atopischer Dermatitis⁷

Nach der Demonstration von VIP-Rezeptoren als neuro-immunmodulatorische Schnittstellen in Tiermodellen allergischer Erkrankungen mittels Gen-Depletionsstudien [Goetzl, et al., 2001] und der Identifikation von VPAC2 als kutan-exprimierten Rezeptor für VIP, wurde die Rolle des Rezeptors bei humanen allergisch-entzündlichen Erkrankungen am Beispiel der atopischen Dermatitis (AD) aufgrund seiner Expression in Entzündungszellen untersucht.

Dabei wurde zuerst mittels *In Situ*-Hybridisierungen und immunhistochemischer Verfahren die Expression des Rezeptors auf der mRNA- und Proteinebene in kutanen Mastzellen untersucht, da dieser Zelltyp bei der Entstehung und Fortführung der Erkrankung eine pathophysiologisch wichtige Rolle spielt

⁷ D. A. Groneberg, P. Welker, T. C. Fischer, Q. T. Dinh, A. Gützkau, C. Peiser, U. Wahn, B. M. Henz, A. Fischer. Downregulation of vasoactive intestinal polypeptide receptor expression in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111(5):1099-1105 (2003).

[Metcalfe, et al., 1997]. Diese Verfahren demonstrierten die Genexpression von VPAC2 in Mastzellen von normalen und AD Geweben, wobei ebenfalls der Ligand VIP in Nervenfasern nachgewiesen werden konnte, welche in der Nähe von Mastzellen lokalisiert waren. Die quantitative Erfassung von Mastzellen in normalen und AD-Geweben durch Toluidin Blau-Färbung zeigte eine signifikante Zunahme dieser Zellpopulation bei AD. Die Expression von VPAC2-mRNA konnte ebenfalls in der humanen Mastzelllinie HMC-1 durch RT-PCR nachgewiesen werden, sowie in frisch isolierten Mastzellen von Mamma-Resektaten und Vorhäuten. Demgegenüber zeigte die Basophilenzelllinie KU-812 keine VPAC2-spezifischen Amplifikate. Die quantitative immunhistochemische Analyse von VPAC2 in Mastzellen zeigte eine Abnahme des Rezeptorproteins unter den pathophysiologischen Bedingungen der AD. Um einen funktionellen Nachweis dieser Gen-Suppression zu erhalten, wurden HMC-1 Zellen mit Phorbol-Myristat-Azetat (PMA, 1ng/ml über 4 h) stimuliert und die Expression des VPAC2 Gens mittels Gene Array Techniken mit der Expression anderer Rezeptorgene verglichen. Dabei zeigte sich ebenfalls eine Suppression der VPAC2-Genexpression.

Zusammenfassend bewiesen diese Studien erstmals eine krankheitsbedingte Regulation eines G-Protein gekoppelten VIP-Rezeptors. Damit stellten sie den Beweis für eine Vielzahl jüngerer Vermutungen dar, die durch genmodifizierende Strategien auf der tierexperimentellen Ebene eine bedeutende Rolle von VIP-Rezeptoren bei entzündlichen Erkrankungen postulierten. In dieser Hinsicht wurde zuerst im Rahmen der experimentellen Arthritis auf eine mögliche krankheitsmodulierende Wirkung VIPs hingewiesen

[Delgado, et al., 2001]. Dabei führte die Gabe von VIP zu einer signifikanten Abnahme der Inzidenz und Stärke von Arthritiszeichen im Tiermodell mit einem Ausbleiben von Knorpeldestruktionen und Gelenkschwellungen. Der Effekt VIPs war ebenfalls mit einer Abnahme autoimmunologischer und entzündlicher Komponenten verbunden, so dass ein potentieller therapeutischer Nutzen des Mediators oder seiner synthetischen Analoga diskutiert werden kann [Delgado, et al., 2001]. Neben dem Bereich der Autoimmunerkrankungen deuteten ebenfalls tierexperimentelle Studien auf eine bedeutsame Rolle VIPs und seiner Rezeptoren bezüglich der Pathogenese allergisch-entzündlicher Erkrankungen hin [Voice, et al., 2002]. So wurde im Rahmen der Konstruktion VPAC2-gendepletierter und VPAC2-transgener Mausstämme die differenzielle Ausbildung allergischer Symptome auf der laborchemischen und funktionellen Ebene untersucht, wobei der Effekt auf T-Lymphozyten im Vordergrund der Untersuchungen stand.

VPAC2-gendepletierete Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund zeigten dabei normale Immunparameter unter physiologischen Bedingungen (Serum-Immunglobulinkonzentrationen, Leukozytenspiegel, Milzzellzahlen). Eine Hapten-evozierte kutane Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ führte zu einer Zunahme der Symptome, wohingegen die Typ I-Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp bei gendepletierten Tieren vermindert war [Goetzl, et al., 2001]. In weiteren tierexperimentellen Studien wurde zur Aufschlüsselung der Rolle des Rezeptors CD4+ T-Lymphozyten-spezifische VPAC2-transgene C57BL/6 Mäuse hergestellt und untersucht.

Dabei zeigte sich, dass durch die VPAC2-Induktion vermehrt Th2-spezifische Interleukine wie IL-4 und IL-5 und weniger Th1-spezifische Mediatoren wie Interferon gamma produziert wurden und VPAC2-transgene Tiere erhöhte IgE- und IgG1-Spiegel sowie erhöhte Eosinophilenzahlen aufwiesen [Voice, et al., 2001]. Zukünftige Studien zur Genexpression von VIP-Rezeptoren in humanen T-Lymphozyten bei allergischen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis oder allergischem Asthma bronchiale werden die Rolle von VPAC2 weiter definieren können.

4 Signaltransduktionsmechanismen

Eine Vielzahl molekularbiologischer Arbeiten konnte in den letzten Jahren einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Expression von Mediatoren wie VIP und intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen nachweisen. In dieser Hinsicht konnte ein bidirektionaler Zusammenhang zwischen Mediatoren und intrazellulären Mechanismen festgestellt werden, wobei auf der einen Seite Mediatoren wie VIP ihre biologischen Effekte durch eine Vielzahl intrazellulärer Moleküle bewirken und auf der anderen Seite diese intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen auch die Genexpression der Mediatoren direkt beeinflussen können. Zu den mit VIP in Verbindung gebrachten Signaltransduktionsmechanismen gehören unter anderem die als „Immediate Early Genes“ (IEG) bekannten Transkriptionsfaktoren c-Jun, C-Fos und c-Myc [Delgado and Ganea, 2001], sowie andere „Mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-abhängige Mechanismen wie Jak1/STAT1 [Delgado, 2003] oder auch Nuclear Factor-kappa B [Delgado, 2002].

Aufgrund der postulierten Zusammenhänge zwischen dem Mediator VIP und dem intrazellulären System der JUN- und FOS-Proteine [Hisanaga, et al., 1993; Mulderry and Dobson, 1996; Wang, et al., 2000], wurden die folgenden Studien durchgeführt.

4.1 Expression von „Immediate Early Genes“ in sensiblen Ganglien⁸

Zur Charakterisierung der Expression der „Immediate Early Genes“ c-Jun und c-Fos in sensiblen Ganglien, welche zu den Atemwegen projizieren, wurden in

dieser Arbeit erste Studien zur basalen Expression der IEGs in Meerschwein, Ratte und Maus durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu einer niedrigen Expression bei Maus und Ratte, in der Spezies Meerschwein eine hohe Expression von c-Jun unter physiologischen, unstimulierten Bedingungen vorherrscht. Dabei zeigten doppelimmunhistochemische Studien eine Expression von c-Jun in 40.6 ± 2.8 % PGP 9.5 –positiver Neurone im Ganglion nodosum. Demgegenüber war c-Jun Expression in 51.6 ± 2.1 % PGP 9.5 –positiver Neurone im Ganglion jugulare und in 46.4 ± 3.0 % PGP 9.5 –positiver Neurone im Ganglion trigeminale zu finden. Eine ähnlich hohe Expression zeigte sich auch mit 42.5 ± 1.3 % PGP 9.5 –positiver Neurone in zervikalen Spinalganglien.

4.2 Expression von c-Jun in sympathischen Ganglien des Meerschweinchens unter normalen Bedingungen und allergischer Atemwegsentzündung⁹

In dieser Arbeit wurde die Expression von c-Jun in sympathischen Ganglien unter normalen und den pathophysiologischen Bedingungen der allergischen Atemwegsentzündung untersucht, wobei die Wahl der Spezies Meerschwein aufgrund früherer Beobachtungen zur grundlegenden funktionellen und morphologischen Ähnlichkeit zwischen der humanen Atemwegsinnervation und

⁸ D. A. Groneberg, S. Wiegand, Q. T. Dinh, C. Peiser, J. Springer, A. Fischer. Expression of immediate early genes in sensory ganglia. *Neurochem. Res.* 26(10):1113-1117 (2001).

⁹ D. A. Groneberg, S. Wiegand, Q. T. Dinh, C. Peiser, A. Fischer. High basal expression of c-jun in guinea pig sympathetic ganglia neurons. *Lung* 180(4):221-228 (2002).

der des Meerschweinchen getroffen wurde [Kallos and Kallos, 1984; Kummer, et al., 1992].

In allen untersuchten Tieren zeigte sich ein starkes neurochemisches Signal für c-Jun in einer Subpopulation von Neuronen des Ganglion stellatum, Ganglion cervicale superius und Ganglion mesentericum superius. Die c-Jun-positiven neuronalen Zellen wurden von nicht-neuronalen DAPI-positiven Zellen durch Inkubation mit einem Antikörper gegen das neuronale Markerprotein PGP 9.5 unterschieden, wobei die PGP 9.5-Immunreaktivität durch ein zytoplasmatisches Signal charakterisiert war. Demgegenüber führte die Inkubation mit c-Jun-Antikörpern zu einer Immunreaktion mit Darstellung des neuronalen Nukleus.

Die quantitative Doppelimmunfluoreszenz-Markierung für c-Jun und PGP 9.5 zeigte unter normalen Bedingungen im Ganglion stellatum einen Prozentsatz von 73.1 ± 2.8 % PGP 9.5-positiver Neurone positiv für c-Jun. Unter den pathophysiologischen Bedingungen der allergischen Atemwegsentzündung kam es nicht zu einer signifikanten Geninduktion von c-Jun (76.1 ± 3.5 % PGP 9.5-positiver Neurone). Im Ganglion cervicale superius war ein prozentualer Anteil von 78.4 ± 3.5 % PGP 9.5-positiver Neurone positiv für c-Jun unter basalen, physiologischen Bedingungen. Nach Allergen-Sensibilisierung und -Provokation kam es ebenfalls nicht zu einem signifikanten Anstieg der Prozentzahl c-Jun-positiver Neurone (82.6 ± 4.6 % PGP 9.5-positiver Neurone). Die Zahl c-Jun positiver Neurone im Ganglion mesentericum superius lag unter basalen Bedingungen mit 59.5 ± 5.0 % PGP 9.5-positiver Neurone deutlich unter den Zahlen des Ganglion stellatum und Ganglion cervicale superius. Auch

in diesem Ganglion, welches keine in die Lunge projizierenden Neurone besitzt, führte eine Ovalbumin-Sensibilisierung und –Provokation nicht zu einer c-Jun Geninduktion (57.5 ± 4.4 % PGP 9.5-positiver Neurone), so dass insgesamt in den verschiedenen Ganglien keine signifikante Vermehrung c-Jun-positiver Neurone bei allergischer Entzündung nachgewiesen werden konnte. Dies kann auf dem fehlenden Ausschluss von Neuronen beruhen, die nicht in die Atemwege projizieren, da in der vorliegenden Studie keine retrograde neuronale Markierung (Tracing) durchgeführt wurde. Bezüglich einer neuronalen Interaktion von VIP und c-Jun im Rahmen der allergischen Atemwegsentzündung müssen zukünftige Studien auf der tierexperimentellen Ebene die Genregulation von VIP in atemwegsprojizierenden Neuronen analysieren sowie mit der c-Jun-Expression korrelieren.

Für adulte sensible Rattenneurone konnte in dieser Hinsicht gezeigt werden, dass Reize wie eine periphere Axotomie zu einer Induktion von c-Jun- und VIP-Genexpression führen [Mulderry and Dobson, 1996]. Studien in kultivierten sensiblen Neuronen führten über eine Blockade der c-Jun-Expression durch Antisense-Oligonukleotid-Mikroinjektion dabei zu der Erkenntnis, dass die VIP-Genexpression durch c-Jun induziert werden kann. Dabei spielen möglicherweise auch anderen Faktoren wie das cAMP-responsive Element (CRE) eine Rolle [Mulderry and Dobson, 1996].

Neben der Induktion von VIP durch c-Jun ist auch umgekehrt ein Effekt von VIP auf die c-Jun Expression möglich. So konnte für T-Lymphozyten gezeigt werden, dass die VIP-abhängige Inhibition der Interleukin 2-Synthese durch eine VIP-induzierte Zunahme der JunB-Expression und Abnahme der c-Jun-

Expression zustande kommt [Wang, et al., 2000].

Erst kürzlich wurde eine potentielle Rolle c-Juns bei der Entwicklung neuer Ansätze zur Therapie allergisch entzündlicher Atemwegserkrankungen postuliert [Leung, et al., 2002]. In dieser Hinsicht stellen sich neue Fragen bezüglich des Zusammenhangs zwischen peptidergen Mediatoren wie VIP und JUN-Proteinen in den Atemwegen und deren Bedeutung für die Modulation allergischer Erkrankungen.

5 Zusammenfassung

Peptiderge Mediatoren sind neben ihrer Funktion bei der Aufrechterhaltung der körpereigenen Homöostase unter physiologischen Bedingungen auch bei der Regulation pathophysiologischer und pathobiochemischer Prozesse chronisch-entzündlicher Erkrankungen maßgeblich beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Rolle durch Untersuchung des Expressionsprofils peptiderger Mediatoren und ihrer Rezeptoren unter normalen Bedingungen charakterisiert und auf dieser Grundlage Veränderungen des Mediatorstoffwechsels bei entzündlichen Erkrankungen erfasst. Aufgrund der geringen Kenntnisse bezüglich der Rolle anti-inflammatorischer Mediatoren wurde dabei insbesondere die Expression und Genregulation des Mediators VIP und seiner Rezeptoren untersucht. Dabei wurden molekularbiologische Methoden verwandt, um definierte Rezeptoren für VIP und verwandte Mediatoren in den Atemwegen und der Haut zu identifizieren. Im Anschluss daran wurde anhand verschiedener entzündlicher Erkrankungen der oberen Atemwege nachgewiesen, dass sich das peptiderge Mediatorprofil krankheitsspezifisch ändert und diese Subgruppen-spezifischen Änderungen nicht als ein universelles Epiphänomen der Entzündungsreaktion zu sehen sind. Ebenso konnte die Veränderung der Genexpression von Rezeptoren für peptiderge Mediatoren untersucht werden, wobei am Beispiel der Hypoxie die Induktion eines in den Atemwegen exprimierten Rezeptors nachgewiesen wurde. Am Beispiel der atopischen Dermatitis konnte darüber hinaus bewiesen werden, dass die Expression von VIP-Rezeptoren im Rahmen einer allergischen Erkrankung vermindert sein kann. Letztlich wurden ebenfalls mit

VIP interferierende Transduktionsmechanismen untersucht, wobei die genauen Interaktionen peptiderger Mediatoren mit diesen intrazellulären Molekülen im Rahmen entzündlicher Erkrankungen noch aufzuschlüsseln sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden kumulativen Arbeit weisen in ihrer Gesamtheit auf eine wesentliche Bedeutung neurogener Mediatoren für pathophysiologische Mechanismen allergisch-entzündlicher Erkrankungen der Atemwege und Haut hin und lassen zukünftige therapeutische Ansätze auf Basis neuro-immunmodulierender Mechanismen sinnvoll erscheinen.

6 Literaturverzeichnis

- Albegger, K.; Hauser-Kronberger, C. E.; Saria, A.; Graf, A. H.; Bernatzky, G. and Hacker, G. W. (1991): Regulatory peptides and general neuroendocrine markers in human nasal mucosa, soft palate and larynx, *Acta Otolaryngol* (vol. 111), No. 2, pp. 373-8.
- Altieri, R. J. and Diamond, L. (1984): Comparison of vasoactive intestinal peptide and isoproterenol relaxant effects in isolated cat airways, *J Appl Physiol* (vol. 56), No. 4, pp. 986-92.
- Altieri, R. J.; Kung, M. and Diamond, L. (1984): Comparative effects of inhaled isoproterenol and vasoactive intestinal peptide on histamine-induced bronchoconstriction in human subjects, *Chest* (vol. 86), No. 1, pp. 153-4.
- Arck, P. C.; Handjiski, B.; Hagen, E.; Joachim, R.; Klapp, B. F. and Paus, R. (2001): Indications for a 'brain-hair follicle axis (BHA)': inhibition of keratinocyte proliferation and up-regulation of keratinocyte apoptosis in telogen hair follicles by stress and substance P, *FASEB J* (vol. 15), No. 13, pp. 2536-8.
- Babu, K. S. and Salvi, S. S. (2000): Aspirin and asthma, *Chest* (vol. 118), No. 5, pp. 1470-6.
- Baraniuk, J. N. (2001): Neurogenic mechanisms in rhinosinusitis, *Curr Allergy Asthma Rep* (vol. 1), No. 3, pp. 252-61.
- Baraniuk, J. N.; Castellino, S.; Lundgren, J. D.; Goff, J.; Mullol, J.; Merida, M.; Shelhamer, J. H. and Kaliner, M. A. (1990): Neuropeptide Y (NPY) in human nasal mucosa, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 3), No. 2, pp. 165-73.

- Baraniuk, J. N.; Lundgren, J. D.; Goff, J.; Mullol, J.; Castellino, S.; Merida, M.; Shelhamer, J. H. and Kaliner, M. A. (1990): Calcitonin gene-related peptide in human nasal mucosa, *Am J Physiol* (vol. 258), No. 2 Pt 1, pp. L81-8.
- Baraniuk, J. N.; Lundgren, J. D.; Okayama, M.; Mullol, J.; Merida, M.; Shelhamer, J. H. and Kaliner, M. A. (1990): Vasoactive intestinal peptide in human nasal mucosa, *J Clin Invest* (vol. 86), No. 3, pp. 825-31.
- Barnes, P. J.; Cadieux, A.; Carstairs, J. R.; Greenberg, B.; Polak, J. M. and Rhoden, K. (1986): Vasoactive intestinal peptide in bovine pulmonary artery: localisation, function and receptor autoradiography, *Br J Pharmacol* (vol. 89), No. 1, pp. 157-62.
- Barnes, P. J.; Chung, K. F. and Page, C. P. (1998): Inflammatory mediators of asthma: an update, *Pharmacol Rev* (vol. 50), No. 4, pp. 515-96.
- Bayliss, W. M. (1901): On the origin from the spinal cord of the vaso-dilator fibres of the hind.limband on the nature of these fibres, *J Physiol (Lond)* (vol. 26), pp. 173-209.
- Bedoui, S.; Kawamura, N.; Straub, R. H.; Pabst, R.; Yamamura, T. and von Horsten, S. (2003): Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk, *J Neuroimmunol* (vol. 134), No. 1-2, pp. 1-11.
- Belvisi, M. G. (2003): Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 16), No. 1, pp. 1-7.
- Bienenstock, J.; MacQueen, G.; Sestini, P.; Marshall, J. S.; Stead, R. H. and Perdue, M. H. (1991): Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo, *Am Rev Respir Dis* (vol. 143), No. 3 Pt 2, pp. S55-8.
- Blackley, C. H. B. (1873): Experimental researches on the causes and nature of *Catarrhus aestivus* (hay-fever or hay-asthma), Baillière, Tindall & Cox, London.

- Bolin, D. R.; Cottrell, J.; Garippa, R.; O'Neill, N.; Simko, B. and O'Donnell, M. (1993): Structure-activity studies of vasoactive intestinal peptide (VIP): cyclic disulfide analogs, *Int J Pept Protein Res* (vol. 41), No. 2, pp. 124-32.
- Boomsma, J. D. and Said, S. I. (1992): The role of neuropeptides in asthma, *Chest* (vol. 101), No. 6 Suppl, pp. 389S-392S.
- Botchkarev, V. A.; Botchkareva, N. V.; Lommatzsch, M.; Peters, E. M.; Lewin, G. R.; Subramaniam, A.; Braun, A.; Renz, H. and Paus, R. (1998): BDNF overexpression induces differential increases among subsets of sympathetic innervation in murine back skin, *Eur J Neurosci* (vol. 10), No. 10, pp. 3276-83.
- Botchkarev, V. A.; Welker, P.; Albers, K. M.; Botchkareva, N. V.; Metz, M.; Lewin, G. R.; Bulfone-Paus, S.; Peters, E. M.; Lindner, G. and Paus, R. (1998): A new role for neurotrophin-3: involvement in the regulation of hair follicle regression (catagen), *Am J Pathol* (vol. 153), No. 3, pp. 785-99.
- Bowden, J. J. and Gibbins, I. L. (1992): Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide Y coexist in non-noradrenergic sympathetic neurons to guinea pig trachea, *J Auton Nerv Syst* (vol. 38), No. 1, pp. 1-19.
- Bundgaard, A.; Enehjelm, S. D. and Aggestrup, S. (1983): Pretreatment of exercise-induced asthma with inhaled vasoactive intestinal peptide (VIP), *Eur J Respir Dis Suppl* (vol. 128), No. Pt 2, pp. 427-9.
- Busto, R.; Prieto, J. C.; Bodega, G.; Zapatero, J. and Carrero, I. (2000): Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung, *Peptides* (vol. 21), No. 2, pp. 265-9.
- Canning, B. J.; Fischer, A. and Udem, B. J. (1998): Pharmacological analysis of the tachykinin receptors that mediate activation of nonadrenergic,

noncholinergic relaxant nerves that innervate guinea pig trachealis, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 284), No. 1, pp. 370-7.

Carstairs, J. R. and Barnes, P. J. (1986): Visualization of vasoactive intestinal peptide receptors in human and guinea pig lung, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 239), No. 1, pp. 249-55.

Chang, M. M.; Leeman, S. E. and Niall, H. D. (1971): Amino-acid sequence of substance P, *Nat New Biol* (vol. 232), No. 29, pp. 86-7.

Chung, K. F. and Barnes, P. J. (1999): Cytokines in asthma, *Thorax* (vol. 54), No. 9, pp. 825-57.

Ciccarelli, E.; Vilardaga, J. P.; De Neef, P.; Di Paolo, E.; Waelbroeck, M.; Bollen, A. and Robberecht, P. (1994): Properties of the VIP-PACAP type II receptor stably expressed in CHO cells, *Regul Pept* (vol. 54), No. 2-3, pp. 397-407.

Coles, S. J.; Said, S. I. and Reid, L. M. (1981): Inhibition by vasoactive intestinal peptide of glycoconjugate and lysozyme secretion by human airways in vitro, *Am Rev Respir Dis* (vol. 124), No. 5, pp. 531-6.

Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J. J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E. and Laburthe, M. (1994): Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 200), No. 2, pp. 769-76.

Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Maoret, J. J.; Gaudin, P.; Nicole, P. and Laburthe, M. (1996): Vasoactive intestinal peptide (VIP)₁ receptor. Three nonadjacent amino acids are responsible for species selectivity with respect to recognition of peptide histidine isoleucineamide, *J Biol Chem* (vol. 271), No. 22, pp. 12795-800.

- Cox, C. P.; Lerner, M. R.; Wells, J. J. and Said, S. I. (1983): Inhaled vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents bronchoconstriction induced by inhaled histamine, *Am Rev Respir Dis* (vol. 127), p. A249.
- Delgado, M. (2002): Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 297), No. 5, pp. 1181-5.
- Delgado, M. (2003): Inhibition of interferon (IFN) gamma-induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide: inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression, *J Biol Chem* (vol. 278), No. 30, pp. 27620-9.
- Delgado, M.; Abad, C.; Martinez, C.; Leceta, J. and Gomariz, R. P. (2001): Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease, *Nat Med* (vol. 7), No. 5, pp. 563-8.
- Delgado, M. and Ganea, D. (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* (vol. 166), No. 2, pp. 1028-40.
- Dessi, P.; Sambuc, R.; Moulin, G.; Ledoray, V. and Cannoni, M. (1994): Effect of heavy smoking on nasal resistance, *Acta Otolaryngol* (vol. 114), No. 3, pp. 305-10.
- Dey, R. D.; Shannon, W. A., Jr. and Said, S. I. (1981): Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects, *Cell Tissue Res* (vol. 220), No. 2, pp. 231-8.

- Diamond, L.; Szarek, J. L.; Gillespie, M. N. and Altieri, R. J. (1983): In vivo bronchodilator activity of vasoactive intestinal peptide in the cat, *Am Rev Respir Dis* (vol. 128), No. 5, pp. 827-32.
- Eedy, D. J.; Shaw, C.; Johnston, C. F. and Buchanan, K. D. (1994): The regional distribution of neuropeptides in human skin as assessed by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography, *Clin Exp Dermatol* (vol. 19), No. 6, pp. 463-72.
- Eynott, P. R.; Groneberg, D. A.; Caramori, G.; Adcock, I. M.; Donnelly, L. E.; Kharitonov, S.; Barnes, P. J. and Chung, K. F. (2002): Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness, *Eur J Pharmacol* (vol. 452), No. 1, pp. 123-33.
- Eynott, P. R.; Paavolainen, N.; Groneberg, D. A.; Noble, A.; Salmon, M.; Nath, P.; Leung, S. Y. and Chung, K. F. (2003): Role of nitric oxide in chronic allergen-induced airway cell proliferation and inflammation, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 304), No. 1, pp. 22-9.
- Fischer, A.; Folkerts, G.; Geppetti, P. and Groneberg, D. A. (2002): Mediators of asthma: nitric oxide, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 15), No. 2, pp. 73-81.
- Fischer, A. and Hoffmann, B. (1996): Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 154), No. 1, pp. 209-16.
- Fischer, A.; Kummer, W.; Couraud, J. Y.; Adler, D.; Branscheid, D. and Heym, C. (1992): Immunohistochemical localization of receptors for vasoactive intestinal peptide and substance P in human trachea, *Lab Invest* (vol. 67), No. 3, pp. 387-93.
- Fischer, A.; McGregor, G. P.; Saria, A.; Philippin, B. and Kummer, W. (1996): Induction of tachykinin gene and peptide expression in guinea pig nodose

primary afferent neurons by allergic airway inflammation, *J Clin Invest* (vol. 98), No. 10, pp. 2284-91.

Fischer, A. R.; Rosenberg, M. A.; Lilly, C. M.; Callery, J. C.; Rubin, P.; Cohn, J.; White, M. V.; Igarashi, Y.; Kaliner, M. A. and Drazen, J. M. (1994): Direct evidence for a role of the mast cell in the nasal response to aspirin in aspirin-sensitive asthma, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 94), No. 6 Pt 1, pp. 1046-56.

Fischer, T. C.; Dinh, Q. T.; Peiser, C.; Loser, C.; Fischer, A. and Groneberg, D. A. (2002): Simultaneous detection of receptor mRNA and ligand protein in human skin tissues, *J Cutan Pathol* (vol. 29), No. 2, pp. 65-71.

Foord, S. M. and Marshall, F. H. (1999): RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors, *Trends Pharmacol Sci* (vol. 20), No. 5, pp. 184-7.

Galli, E.; Cicconi, R.; Rossi, P.; Casati, A.; Brunetti, E. and Mancino, G. (2003): Atopic dermatitis: molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches, *Curr Mol Med* (vol. 3), No. 2, pp. 127-38.

Goetzl, E. J.; Voice, J. K.; Shen, S.; Dorsam, G.; Kong, Y.; West, K. M.; Morrison, C. F. and Harmar, A. J. (2001): Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC(2) receptor for vasoactive intestinal peptide, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 98), No. 24, pp. 13854-9.

Gomariz, R. P.; Martinez, C.; Abad, C.; Leceta, J. and Delgado, M. (2001): Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives, *Curr Pharm Des* (vol. 7), No. 2, pp. 89-111.

Gourlet, P.; De Neef, P.; Cnudde, J.; Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1997): In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor, *Peptides* (vol. 18), No. 10, pp. 1555-60.

- Gourlet, P.; Vandermeers, A.; Vertongen, P.; Rathe, J.; De Neef, P.; Cnudde, J.; Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1997): Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists, *Peptides* (vol. 18), No. 10, pp. 1539-45.
- Gourlet, P.; Vertongen, P.; Vandermeers, A.; Vandermeers-Piret, M. C.; Rathe, J.; De Neef, P.; Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1997): The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass, *Peptides* (vol. 18), No. 3, pp. 403-8.
- Gozes, I. and Brenneman, D. E. (1989): VIP: molecular biology and neurobiological function, *Mol Neurobiol* (vol. 3), No. 4, pp. 201-36.
- Gozes, I.; Fridkin, M. and Brenneman, D. E. (1995): A VIP hybrid antagonist: from developmental neurobiology to clinical applications, *Cell Mol Neurobiol* (vol. 15), No. 6, pp. 675-87.
- Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y. and Shows, T. B. (1987): Sequential expression in the nervous system of c-myb and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24, *Somat Cell Mol Genet* (vol. 13), No. 4, pp. 305-13.
- Greenberg, B.; Rhoden, K. and Barnes, P. J. (1987): Relaxant effects of vasoactive intestinal peptide and peptide histidine isoleucine in human and bovine pulmonary arteries, *Blood Vessels* (vol. 24), No. 1-2, pp. 45-50.
- Groneberg, D. A. (2003): Expression, Lokalisation und funktionelle Aspekte des Peptidtransporters PEPT2 im gesunden Atemtrakt und bei Mukoviszidose, *Pneumologie* (vol. 57), No. 2, pp. 104-5.
- Groneberg, D. A.; Doring, F.; Nickolaus, M.; Daniel, H. and Fischer, A. (2001): Expression of PEPT2 peptide transporter mRNA and protein in glial cells of rat dorsal root ganglia, *Neurosci Lett* (vol. 304), No. 3, pp. 181-4.

- Groneberg, D. A.; Eynott, P. R.; Doring, F.; Thai Dinh, Q.; Oates, T.; Barnes, P. J.; Chung, K. F.; Daniel, H. and Fischer, A. (2002): Distribution and function of the peptide transporter PEPT2 in normal and cystic fibrosis human lung, *Thorax* (vol. 57), No. 1, pp. 55-60.
- Groneberg, D. A.; Eynott, P. R.; Lim, S.; Oates, T.; Wu, R.; Carlstedt, I.; Roberts, P.; McCann, B.; Nicholson, A. G.; Harrison, B. D. and Chung, K. F. (2002): Expression of respiratory mucins in fatal status asthmaticus and mild asthma, *Histopathology* (vol. 40), No. 4, pp. 367-73.
- Groneberg, D. A.; Eynott, P. R.; Oates, T.; Lim, S.; Wu, R.; Carlstedt, I.; Nicholson, A. G. and Chung, K. F. (2002): Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung, *Respir Med* (vol. 96), No. 2, pp. 81-6.
- Groneberg, D. A. and Fischer, A. (2001): Endogenous opioids as mediators of asthma, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 14), No. 5, pp. 383-9.
- Groneberg, D. A.; Nickolaus, M.; Springer, J.; Doring, F.; Daniel, H. and Fischer, A. (2001): Localization of the peptide transporter PEPT2 in the lung: implications for pulmonary oligopeptide uptake, *Am J Pathol* (vol. 158), No. 2, pp. 707-14.
- Groneberg, D. A.; Peiser, C.; Dinh, Q. T.; Matthias, J.; Eynott, P. R.; Heppt, W.; Carlstedt, I.; Witt, C.; Fischer, A. and Chung, K. F. (2003): Distribution of respiratory mucin proteins in human nasal mucosa, *Laryngoscope* (vol. 113), No. 3, pp. 520-4.
- Groneberg, D. A.; Springer, J. and Fischer, A. (2001): Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 14), No. 5, pp. 391-401.
- Groneberg, D. A.; Wagner, U. and Chung, K. F. (2004): Mucus and fatal asthma, *Am J Med* (vol. 116), pp. 66-67.

- Hachisu, M.; Hiranuma, T.; Tani, S. and Iizuka, T. (1991): Enzymatic degradation of helodermin and vasoactive intestinal polypeptide, *J Pharmacobiodyn* (vol. 14), No. 3, pp. 126-31.
- Haegerstrand, A.; Jonzon, B.; Dalsgaard, C. J. and Nilsson, J. (1989): Vasoactive intestinal polypeptide stimulates cell proliferation and adenylate cyclase activity of cultured human keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 86), No. 15, pp. 5993-6.
- Hamasaki, Y.; Mojarad, M. and Said, S. I. (1983): Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol, and PGE₁, *J Appl Physiol* (vol. 54), No. 6, pp. 1607-11.
- Hamasaki, Y.; Saga, T.; Mojarad, M. and Said, S. I. (1983): Vasoactive intestinal peptide counteracts leukotriene D₄-induced contractions of guinea pig trachea, lung, and pulmonary artery, *Trans Assoc Am Physicians* (vol. 96), pp. 406-11.
- Hand, J. M.; Laravuso, R. B. and Will, J. A. (1984): Relaxation of isolated guinea pig trachea, bronchi and pulmonary arteries produced by vasoactive intestinal peptide (VIP), *Eur J Pharmacol* (vol. 98), No. 2, pp. 279-84.
- Harmar, A. J.; Arimura, A.; Gozes, I.; Journot, L.; Laburthe, M.; Pisegna, J. R.; Rawlings, S. R.; Robberecht, P.; Said, S. I.; Sreedharan, S. P.; Wank, S. A. and Waschek, J. A. (1998): International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, *Pharmacol Rev* (vol. 50), No. 2, pp. 265-70.
- Hisanaga, K.; Sagar, S. M.; Koistinaho, J.; Hicks, K. J. and Sharp, F. R. (1993): VIP-induced stellation and immediate early gene expression in astrocytes: effects of dexamethasone, *Neurosci Lett* (vol. 156), No. 1-2, pp. 57-60.

- Howarth, P. H. (1997): Mediators of nasal blockage in allergic rhinitis, *Allergy* (vol. 52), No. 40 Suppl, pp. 12-8.
- Hua, X. Y.; Theodorsson-Norheim, E.; Brodin, E.; Lundberg, J. M. and Hokfelt, T. (1985): Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig, *Regul Pept* (vol. 13), No. 1, pp. 1-19.
- Inagaki, N.; Yoshida, H.; Mizuta, M.; Mizuno, N.; Fujii, Y.; Gono, T.; Miyazaki, J. and Seino, S. (1994): Cloning and functional characterization of a third pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor subtype expressed in insulin-secreting cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 91), No. 7, pp. 2679-83.
- Ishihara, T.; Shigemoto, R.; Mori, K.; Takahashi, K. and Nagata, S. (1992): Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide, *Neuron* (vol. 8), No. 4, pp. 811-9.
- Ito, O. and Tachibana, S. (1991): Vasoactive intestinal polypeptide precursors have highly potent bronchodilatory activity, *Peptides* (vol. 12), No. 1, pp. 131-7.
- Jancso, N.; Jancso-Gabor, A. and Szolcsanyi, J. (1967): Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin, *Br J Pharmacol* (vol. 31), No. 1, pp. 138-51.
- Jones, A. S. (1988): Non-allergic perennial rhinitis, *Biomed Pharmacother* (vol. 42), No. 8, pp. 499-503.
- Jones, A. S. (1997): Autonomic reflexes and non-allergic rhinitis, *Allergy* (vol. 52), No. 36 Suppl, pp. 14-9.

- Joos, G. F.; De Swert, K. O. and Pauwels, R. A. (2001): Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists, *Eur J Pharmacol* (vol. 429), No. 1-3, pp. 239-50.
- Joos, G. F.; Germonpre, P. R. and Pauwels, R. A. (2000): Role of tachykinins in asthma, *Allergy* (vol. 55), No. 4, pp. 321-37.
- Joos, G. F. and Pauwels, R. A. (2001): Tachykinin receptor antagonists: potential in airways diseases, *Curr Opin Pharmacol* (vol. 1), No. 3, pp. 235-41.
- Kallos, P. and Kallos, L. (1984): Experimental asthma in guinea-pigs revisited, *Int Arch Allergy Appl Immunol* (vol. 73), pp. 77-85.
- Kapas, S.; Catt, K. J. and Clark, A. J. (1995): Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor, *J Biol Chem* (vol. 270), No. 43, pp. 25344-7.
- Keith, I. M. (2000): The role of endogenous lung neuropeptides in regulation of the pulmonary circulation, *Physiol Res* (vol. 49), No. 5, pp. 519-37.
- Kemp, A. S. (2003): Cost of illness of atopic dermatitis in children: a societal perspective, *Pharmacoeconomics* (vol. 21), No. 2, pp. 105-13.
- Kennedy, S. P.; Sun, D.; Oleynek, J. J.; Hoth, C. F.; Kong, J. and Hill, R. J. (1998): Expression of the rat adrenomedullin receptor or a putative human adrenomedullin receptor does not correlate with adrenomedullin binding or functional response, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 244), No. 3, pp. 832-7.
- Kotani, H.; Hoshimaru, M.; Nawa, H. and Nakanishi, S. (1986): Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 83), No. 18, pp. 7074-8.

- Kowalski, M. L. (2000): Rhinosinusitis and nasal polyposis in aspirin sensitive and aspirin tolerant patients: are they different?, *Thorax* (vol. 55), No. Suppl 2, pp. S84-6.
- Kraneveld, A. D. and Nijkamp, F. P. (2001): Tachykinins and neuro-immune interactions in asthma, *Int Immunopharmacol* (vol. 1), No. 9-10, pp. 1629-50.
- Kummer, W.; Fischer, A.; Kurkowski, R. and Heym, C. (1992): The sensory and sympathetic innervation of guinea-pig lung and trachea as studied by retrograde neuronal tracing and double-labelling immunohistochemistry, *Neuroscience* (vol. 49), No. 3, pp. 715-37.
- Kusakabe, T.; Hirakawa, H.; Matsuda, H.; Kawakami, T.; Takenaka, T. and Hayashida, Y. (2003): Peptidergic innervation in the rat carotid body after 2, 4, and 8 weeks of hypocapnic hypoxic exposure, *Histol Histopathol* (vol. 18), No. 2, pp. 409-18.
- Lacroix, J. S.; Correia, F.; Fathi, M. and Grouzmann, E. (1997): Post-exercise nasal vasoconstriction and hyporeactivity: possible involvement of neuropeptide Y, *Acta Otolaryngol* (vol. 117), No. 4, pp. 609-13.
- Laitinen, L. A.; Laitinen, A.; Salonen, R. O. and Widdicombe, J. G. (1987): Vascular actions of airway neuropeptides, *Am Rev Respir Dis* (vol. 136), No. 6 Pt 2, pp. S59-64.
- Leung, D. Y. and Bieber, T. (2003): Atopic dermatitis, *Lancet* (vol. 361), No. 9352, pp. 151-60.
- Leung, S. Y.; Eynott, P. R.; Nath, P.; Adcock, I. M. and Chung, K. F. (2002): Effects of Selective C-JUN NH₂-Terminal Kinase Inhibition in a Sensitized Brown-Norway Rat Model of Chronic Allergic Asthma, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 167), No. 7, p. A344.

- Lilly, C. M.; Drazen, J. M. and Shore, S. A. (1993): Peptidase modulation of airway effects of neuropeptides, *Proc Soc Exp Biol Med* (vol. 203), No. 4, pp. 388-404.
- Linden, A. (1996): NANC neural control of airway smooth muscle tone, *Gen Pharmacol* (vol. 27), No. 7, pp. 1109-21.
- Linden, A.; Hansson, L.; Andersson, A.; Palmqvist, M.; Arvidsson, P.; Lofdahl, C. G.; Larsson, P. and Lotvall, J. (2003): Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma, *Thorax* (vol. 58), No. 3, pp. 217-21.
- Lund, V. (1998): Allergic rhinitis--making the correct diagnosis, *Clin Exp Allergy* (vol. 28), No. Suppl 6, pp. 25-8.
- Lundberg, J. M.; Anggard, A.; Emson, P.; Fahrenkrug, J. and Hokfelt, T. (1981): Vasoactive intestinal polypeptide and cholinergic mechanisms in cat nasal mucosa: studies on choline acetyltransferase and release of vasoactive intestinal polypeptide, *Proc Natl Acad Sci U S A* (vol. 78), No. 8, pp. 5255-9.
- Lundberg, J. M.; Fahrenkrug, J.; Hokfelt, T.; Martling, C. R.; Larsson, O.; Tatemoto, K. and Anggard, A. (1984): Co-existence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man, *Peptides* (vol. 5), No. 3, pp. 593-606.
- Lundberg, J. M.; Franco-Cereceda, A.; Hua, X.; Hokfelt, T. and Fischer, J. A. (1985): Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin, *Eur J Pharmacol* (vol. 108), No. 3, pp. 315-9.
- Lundberg, J. M.; Hokfelt, T.; Martling, C. R.; Saria, A. and Cuello, C. (1984): Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of

various mammals including man, *Cell Tissue Res* (vol. 235), No. 2, pp. 251-61.

Lung, M. A. and Widdicombe, J. G. (1987): Lung reflexes and nasal vascular resistance in the anaesthetized dog, *J Physiol (Lond)* (vol. 386), pp. 465-74.

Lutz, E. M.; Sheward, W. J.; West, K. M.; Morrow, J. A.; Fink, G. and Harmar, A. J. (1993): The VIP2 receptor: molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide, *FEBS Lett* (vol. 334), No. 1, pp. 3-8.

Maggi, C. A. (1995): The mammalian tachykinin receptors, *Gen Pharmacol* (vol. 26), No. 5, pp. 911-44.

Maggi, C. A. (1996): Tachykinins in the autonomic nervous system, *Pharmacol Res* (vol. 33), No. 3, pp. 161-70.

Maggi, C. A.; Giachetti, A.; Dey, R. D. and Said, S. I. (1995): Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins, *Physiol Rev* (vol. 75), No. 2, pp. 277-322.

Matran, R.; Alving, K.; Martling, C. R.; Lacroix, J. S. and Lundberg, J. M. (1989): Effects of neuropeptides and capsaicin on tracheobronchial blood flow of the pig, *Acta Physiol Scand* (vol. 135), No. 3, pp. 335-42.

Merten, M. D.; Kammouni, W.; Renaud, W.; Birg, F.; Mattei, M. G. and Figarella, C. (1996): A transformed human tracheal gland cell line, MM-39, that retains serous secretory functions, *Am J Respir Cell Mol Biol* (vol. 15), No. 4, pp. 520-8.

Metcalfe, D. D.; Baram, D. and Mekori, Y. A. (1997): Mast cells, *Physiol Rev* (vol. 77), No. 4, pp. 1033-79.

Mikaelian, A. J. (1989): Vasomotor rhinitis, *Ear Nose Throat J* (vol. 68), No. 3, pp. 207-10, 213-8.

- Morice, A.; Unwin, R. J. and Sever, P. S. (1983): Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects, *Lancet* (vol. 2), No. 8361, pp. 1225-7.
- Mulderry, P. K. and Dobson, S. P. (1996): Regulation of VIP and other neuropeptides by c-Jun in sensory neurons: implications for the neuropeptide response to axotomy, *Eur J Neurosci* (vol. 8), No. 12, pp. 2479-91.
- Nandiwada, P. A.; Kadowitz, P. J.; Said, S. I.; Mojarad, M. and Hyman, A. L. (1985): Pulmonary vasodilator responses to vasoactive intestinal peptide in the cat, *J Appl Physiol* (vol. 58), No. 5, pp. 1723-8.
- Nathanson, I.; Widdicombe, J. H. and Barnes, P. J. (1983): Effect of vasoactive intestinal peptide on ion transport across dog tracheal epithelium, *J Appl Physiol* (vol. 55), No. 6, pp. 1844-8.
- Nawa, H.; Kotani, H. and Nakanishi, S. (1984): Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing, *Nature* (vol. 312), No. 5996, pp. 729-34.
- Obara, H.; Kusunoki, M.; Mori, M.; Mikawa, K. and Iwai, S. (1989): The effects of various peptides on the isolated pulmonary artery, *Peptides* (vol. 10), No. 1, pp. 241-3.
- O'Donnell, M.; Garippa, R. J.; Rinaldi, N.; Selig, W. M.; Simko, B.; Renzetti, L.; Tannu, S. A.; Wasserman, M. A.; Welton, A. and Bolin, D. R. (1994): Ro 25-1553: a novel, long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part I: In vitro and in vivo bronchodilator studies, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 270), No. 3, pp. 1282-8.
- O'Donnell, M.; Garippa, R. J.; Rinaldi, N.; Selig, W. M.; Tocker, J. E.; Tannu, S. A.; Wasserman, M. A.; Welton, A. and Bolin, D. R. (1994): Ro 25-1553: a novel,

long-acting vasoactive intestinal peptide agonist. Part II: Effect on in vitro and in vivo models of pulmonary anaphylaxis, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 270), No. 3, pp. 1289-94.

Palmer, J. B.; Cuss, F. M. and Barnes, P. J. (1986): VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways, *J Appl Physiol* (vol. 61), No. 4, pp. 1322-8.

Peatfield, A. C.; Barnes, P. J.; Bratcher, C.; Nadel, J. A. and Davis, B. (1983): Vasoactive intestinal peptide stimulates tracheal submucosal gland secretion in ferret, *Am Rev Respir Dis* (vol. 128), No. 1, pp. 89-93.

Peiser, C.; Springer, J.; Groneberg, D. A.; McGregor, G. P.; Fischer, A. and Lang, R. E. (2002): Leptin receptor expression in nodose ganglion cells projecting to the rat gastric fundus, *Neurosci Lett* (vol. 320), No. 1-2, pp. 41-4.

Rawlings, S. R.; Piuz, I.; Schlegel, W.; Bockaert, J. and Journot, L. (1995): Differential expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptor subtypes in clonal pituitary somatotrophs and gonadotrophs, *Endocrinology* (vol. 136), No. 5, pp. 2088-98.

Richardson, J. D. and Vasko, M. R. (2002): Cellular mechanisms of neurogenic inflammation, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 302), No. 3, pp. 839-45.

Richardson, P. S. and Webber, S. E. (1987): The control of mucous secretion in the airways by peptidergic mechanisms, *Am Rev Respir Dis* (vol. 136), No. 6 Pt 2, pp. S72-6.

Saga, T. and Said, S. I. (1984): Vasoactive intestinal peptide relaxes isolated strips of human bronchus, pulmonary artery, and lung parenchyma, *Trans Assoc Am Physicians* (vol. 97), pp. 304-10.

- Said, S. I. and Mutt, V. (1969): A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity, *Scand J Clin Lab Invest Suppl* (vol. 107), pp. 51-6.
- Said, S. I. and Mutt, V. (1970): Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine, *Science* (vol. 169), No. 951, pp. 1217-8.
- Said, S. I. and Mutt, V. (1970): Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut, *Nature* (vol. 225), No. 235, pp. 863-4.
- Sakai, N.; Tamaoki, J.; Kobayashi, K.; Kanemura, T.; Isono, K.; Takeyama, K.; Takeuchi, S. and Takizawa, T. (1991): Vasoactive intestinal peptide stimulates ciliary motility in rabbit tracheal epithelium: modulation by neutral endopeptidase, *Regul Pept* (vol. 34), No. 1, pp. 33-41.
- Schmidt, D. T.; Ruhlmann, E.; Waldeck, B.; Branscheid, D.; Luts, A.; Sundler, F. and Rabe, K. F. (2001): The effect of the vasoactive intestinal polypeptide agonist Ro 25-1553 on induced tone in isolated human airways and pulmonary artery, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (vol. 364), No. 4, pp. 314-20.
- Scholzen, T.; Armstrong, C. A.; Bunnett, N. W.; Luger, T. A.; Olerud, J. E. and Ansel, J. C. (1998): Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems, *Exp Dermatol* (vol. 7), No. 2-3, pp. 81-96.
- Sexton, P. M.; Albiston, A.; Morfis, M. and Tilakaratne, N. (2001): Receptor activity modifying proteins, *Cell Signal* (vol. 13), No. 2, pp. 73-83.
- Sharaf, H., Said, S. I. (1993): Tracheal relaxant response to vasoactive intestinal peptide (VIP): influence of airway epithelium and peptidases (abstract), *FASEB J* (vol. 7), p. A686.

- Shimura, S.; Sasaki, T.; Ikeda, K.; Sasaki, H. and Takishima, T. (1988): VIP augments cholinergic-induced glycoconjugate secretion in tracheal submucosal glands, *J Appl Physiol* (vol. 65), No. 6, pp. 2537-44.
- Springer, J.; Geppetti, P.; Fischer, A. and Groneberg, D. A. (2003): Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 16), No. 3, pp. 121-30.
- Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J. X. and Goetzi, E. J. (1993): Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 193), No. 2, pp. 546-53.
- Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J. F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M. and Robberecht, P. (1994): Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts, *Biochem Biophys Res Commun* (vol. 205), No. 3, pp. 1617-24.
- Szczeklik, A. and Stevenson, D. D. (1999): Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis and management, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 104), No. 1, pp. 5-13.
- Tai, C. F. and Baraniuk, J. N. (2002): Upper airway neurogenic mechanisms, *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (vol. 2), No. 1, pp. 11-9.
- Tainio, H. (1987): Cytochemical localization of VIP-stimulated adenylate cyclase activity in human sweat glands, *Dev Biol* (vol. 123), No. 1, pp. 179-90.
- Takeda, N.; Kalubi, B.; Abe, Y.; Irifune, M.; Ogino, S. and Matsunaga, T. (1993): Neurogenic inflammation in nasal allergy: histochemical and pharmacological studies in guinea pigs. A review, *Acta Otolaryngol Suppl* (vol. 501), pp. 21-4.
- Togias, A. (2003): Rhinitis and asthma: evidence for respiratory system integration, *J Allergy Clin Immunol* (vol. 111), No. 6, pp. 1171-83.

- Tregear, G. W.; Niall, H. D.; Potts, J. T., Jr.; Leeman, S. E. and Chang, M. M. (1971): Synthesis of substance P, *Nat New Biol* (vol. 232), No. 29, pp. 87-9.
- Usdin, T. B.; Bonner, T. I. and Mezey, E. (1994): Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions, *Endocrinology* (vol. 135), No. 6, pp. 2662-80.
- van der Velden, V. H. and Hulsmann, A. R. (1999): Autonomic innervation of human airways: structure, function, and pathophysiology in asthma, *Neuroimmunomodulation* (vol. 6), No. 3, pp. 145-59.
- Voice, J. K.; Dorsam, G.; Chan, R. C.; Grinninger, C.; Kong, Y. and Goetzl, E. J. (2002): Immunoeffector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide, *Regul Pept* (vol. 109), No. 1-3, pp. 199-208.
- Voice, J. K.; Dorsam, G.; Lee, H.; Kong, Y. and Goetzl, E. J. (2001): Allergic diathesis in transgenic mice with constitutive T cell expression of inducible vasoactive intestinal peptide receptor, *FASEB J* (vol. 15), No. 13, pp. 2489-96.
- von Euler, U. S. and Gaddum, J. H. (1931): An unidentified depressor substance in certain tissue extracts, *J Physiol (Lond)* (vol. 72), pp. 74-87.
- Wagner, U.; Bredenbroker, D.; Storm, B.; Tackenberg, B.; Fehmann, H. C. and von Wichert, P. (1998): Effects of VIP and related peptides on airway mucus secretion from isolated rat trachea, *Peptides* (vol. 19), No. 2, pp. 241-5.
- Wallengren, J. (1997): Vasoactive peptides in the skin, *J Investig Dermatol Symp Proc* (vol. 2), No. 1, pp. 49-55.
- Wang, H. Y.; Jiang, X. M. and Ganea, D. (2000): The neuropeptides VIP and PACAP inhibit IL-2 transcription by decreasing c-Jun and increasing JunB expression in T cells, *J Neuroimmunol* (vol. 104), No. 1, pp. 68-78.

- Webber, S. E. and Widdicombe, J. G. (1987): The effect of vasoactive intestinal peptide on smooth muscle tone and mucus secretion from the ferret trachea, *Br J Pharmacol* (vol. 91), No. 1, pp. 139-48.
- Wei, Y. and Mojsov, S. (1996): Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide: implications for their role in human physiology, *J Neuroendocrinol* (vol. 8), No. 11, pp. 811-7.
- Widdicombe, J. G. (1998): Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 158), No. 5 Pt 3, pp. S171-5.
- Widdicombe, J. G. (2003): Overview of neural pathways in allergy and asthma, *Pulm Pharmacol Ther* (vol. 16), No. 1, pp. 23-30.
- Xia, M.; Sreedharan, S. P.; Bolin, D. R.; Gaufo, G. O. and Goetzl, E. J. (1997): Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor, *J Pharmacol Exp Ther* (vol. 281), No. 2, pp. 629-33.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Axel Fischer danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit in der von ihm geleiteten Arbeitsgruppe und die vielen intensiven Diskussionen und freundschaftlichen Gespräche, die mir bei der Verwirklichung eigener Ideen und Konzepte halfen.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank auch meinen anderen akademischen Lehrern, die mich in den letzten Jahren im wissenschaftlichen und klinischen Bereich gefördert haben. Besonders hervorzuheben sind dabei:

Herr Prof. Dr. Ulrich Wahn, der eine in Deutschland wohl einzigartige Organisationsstruktur geschaffen hat, die es mir ermöglichte, gleichzeitig wissenschaftlich und klinisch unter den besten Bedingungen zu arbeiten.

Herr Prof. Dr. Christian Witt, der mir die klinischen und wissenschaftlichen Grundlagen der Pneumologie vermittelt hat und mir dabei frühzeitig die Bedeutung molekularer Mechanismen zum Verständnis von Lungenerkrankungen nahe legte.

Frau Prof. Dr. Hannelore Daniel. Auch nach unserer gemeinsamen Zeit an der Justus-Liebig-Universität in Giessen unterstützte sie meine wissenschaftlichen Arbeiten durch viele Gespräche und Einladungen in ihr Institut an der Technischen Universität München.

Herr Prof. Dr. K. Fan Chung und Herr Prof. Dr. Peter J. Barnes, sowie Frau Prof. M. Belvisi, die mich bei meinen Aufenthalten am National Heart and Lung Institute und Royal Brompton Hospital, Imperial College, London in freundschaftlicher Weise unterstützten.

Herr Privatdozent Dr. Ulrich Wagner, der mir als erfahrener Pneumologe bei der Ausarbeitung neuer Konzepte behilflich war.

Herr Prof. Dr. Peter Zabel, der mir während meiner kurzen Zeit an der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel und der Universität zu Lübeck alle Möglichkeiten eröffnete, meine Forschungsarbeiten fortzuführen.

Herr Professor Dr. Sami I. Said, der den Neuromediator VIP im Jahr 1969 identifiziert hat, sei gedankt für seine vielen Hilfestellungen bei der Untersuchung VIPs und seiner Rezeptoren, die er unter anderen bei einem Besuch in unserer Arbeitsgruppe 2001 gegeben hat. Nur durch seine Vorarbeiten in den sechziger und siebziger Jahren konnten die hier beschriebenen Studien verwirklicht werden.

Für die geduldige und freundliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeiten und die vielen netten Stunden möchte ich mich darüber hinaus sehr herzlich bei meinen Kollegen und Freunden Fr. cand. med. Carolin Bester, Hr. Dr. Q. Thai Dinh, Fr. Dr. Tanja Fischer, Hr. cand. med. Alexander Gerber, Frau Petra Hartmann, Fr. cand. med. Antonia Kretschmer, Hr. Arne Kuhlmei, Fr. cand. med. Nadja Maaß, Hr. cand. med. Thomas Medveczky, Hr. Dr. Dr. Christian Peiser, Hr. Dr. David Quarcoo, Fr. cand. med. Anne Radtke, Hr. Dr. Roland Schmitt, Fr. Petra Staats, Fr. Rita Strozynski, Fr. Dr. Pia Welker und Fr. Silke Wiegand bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich ebenfalls bei meinen weiteren Koautoren bedanken, die mir im Rahmen von Kooperationen halfen, die in dieser kumulativen Arbeit beschriebenen Daten zu erheben. Dies sind neben den bereits oben erwähnten: Fr. Dr. Annete Cryer, Hr. Dr. Jörg Dötsch, Hr. Prof. Dr. Dr. Friedrich Grimminger, Hr. Dr. Andreas Grützkau, Fr. Dr. Anika Hanisch, Hr. Priv.-Doz. Dr. Jörg Hänze, Fr. Prof. Dr. Beate M. Henz, Hr. Prof. Dr. Werner Heppt, Hr. Dr. Christoph Löser, Hr. Prof. Dr. Werner Rascher, Hr. Dr. Frank Rose, Hr. Prof. Dr.

Werner Seeger, Fr. Dr. Anke Wussow und Fr. Dr. Martina Zweng.

Der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, der Gesellschaft für Lungen- und Atmungsforschung, der Deutschen Atemwegsliga, der Deutschen Lungenstiftung, der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, der Deutschen Nierenstiftung sowie der Hessischen Landesärztekammer und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die vielen wissenschaftlichen Auszeichnungen und Förderungen, die es mir als Nachwuchswissenschaftler bereits in einem frühen Stadium ermöglichten, meine Ideen und Projekte zu realisieren.

Zuletzt möchte ich mich für die immerwährende liebevolle Hilfe und Unterstützung bei meiner Frau Beatrix, meinen Eltern Angela und Mike und bei meinen Geschwistern Rafael und Sarah bedanken.

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt:

dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden und die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind;

dass mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist;

dass kein Habilitationsverfahren im Geltungsbereich des Grundgesetzes im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet früher durchgeführt oder bereits wiederholt wurde;

dass nicht gleichzeitig an anderer Stelle ein Habilitationsverfahren im gleichen wissenschaftlichen Fach oder Fachgebiet durchgeführt wird;

dass kein staatsanwaltliches Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig ist.

Berlin, den 3. September 2003